

ACTA DE EVALUACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Año académico 2017/18

DOCTORANDO: MANTECÓN RAMIRO, CAROLINA
D.N.I./PASAPORTE: ****1725W

PROGRAMA DE DOCTORADO: D420-CIENCIAS DE LA SALUD
DPTO. COORDINADOR DEL PROGRAMA: BIOLOGÍA DE SISTEMAS
TITULACIÓN DE DOCTOR EN: DOCTOR/A POR LA UNIVERSIDAD DE ALCALÁ


En el día de hoy 27/10/2017, reunido el tribunal de evaluación nombrado por la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado de la Universidad y constituido por los miembros que suscriben la presente Acta, el aspirante defendió su Tesis Doctoral, elaborada bajo la dirección de JORGE MONTSERRAT SANZ // CRISTINA ZARAGOZÁ ARNÁEZ.

Sobre el siguiente tema: INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES: FLAVONOIDES Y EFECTO ANTIPLAQUETARIO


Finalizada la defensa y discusión de la tesis, el tribunal acordó otorgar la CALIFICACIÓN GLOBAL¹ de (no apto, aprobado, notable y sobresaliente): SOBRESALIENTE

Alcalá de Henares, 27 de octubre de 2017

EL PRESIDENTE


Fdo.: Juan Antonio

EL SECRETARIO


Fdo.: M. Teresa Martín

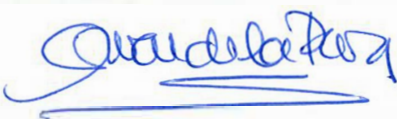
EL VOCAL


Fdo.: Juan Berrocal

Con fecha 28 de noviembre de 2017 la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado, a la vista de los votos emitidos de manera anónima por el tribunal que ha juzgado la tesis, resuelve:

- ☒ Conceder la Mención de "Cum Laude"
☐ No conceder la Mención de "Cum Laude"

La Secretaria de la Comisión Delegada



FIRMA DEL ALUMNO,



Fdo.: CAROLINA MANTECÓN RAMIRO

¹ La calificación podrá ser "no apto" "aprobado" "notable" y "sobresaliente". El tribunal podrá otorgar la mención de "cum laude" si la calificación global es de sobresaliente y se emite en tal sentido el voto secreto positivo por unanimidad.

En aplicación del art. 14.7 del RD. 99/2011 y el art. 14 del Reglamento de Elaboración, Autorización y Defensa de la Tesis Doctoral, la Comisión Delegada de la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado y Doctorado, en sesión pública de fecha 28 de noviembre, procedió al escrutinio de los votos emitidos por los miembros del tribunal de la tesis defendida por MANTECÓN RAMIRO, CAROLINA, el día 27/10/17, titulada *INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES: FLAVONOIDES Y EFECTO ANTIPLAQUETARIO*, para determinar, si a la misma, se le concede la mención "cum laude", arrojando como resultado el voto favorable de todos los miembros del tribunal.

Por lo tanto, la Comisión de Estudios Oficiales de Posgrado **resuelve otorgar** a dicha tesis la

MENCIÓN "CUM LAUDE"

Alcalá de Henares, 7 de diciembre de 2017
EL PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE ESTUDIOS
OFICIALES DE POSGRADO Y DOCTORADO




Juan Ramón Velasco Pérez

Copia por e-mail a:

Doctorando: MANTECÓN RAMIRO, CAROLINA

Secretario del Tribunal: TERESA MARTÍN LÓPEZ. T.U. Dpto. Ciencias Biomédicas. Univ. Alcalá

Director/a de Tesis: JORGE MONTSERRAT SANZCRISTINA ZARAGOZÁ ARNÁEZ



Universidad
de Alcalá

ESCUELA DE DOCTORADO
Servicio de Estudios Oficiales de
Posgrado

DILIGENCIA DE DEPÓSITO DE TESIS.

Comprobado que el expediente académico de D./D^a _____
reúne los requisitos exigidos para la presentación de la Tesis, de acuerdo a la normativa vigente, y habiendo
presentado la misma en formato: ☐ soporte electrónico ☐ impreso en papel, para el depósito de la
misma, en el Servicio de Estudios Oficiales de Posgrado, con el nº de páginas: _____ se procede, con
fecha de hoy a registrar el depósito de la tesis.

Alcalá de Henares a _____ de _____ de 20____



Fdo. El Funcionario



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES: FLAVONOIDES Y EFECTO ANTIPLAQUETARIO

**Tesis Doctoral presentada por
CAROLINA MANTECÓN RAMIRO**

Año

2017



Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES: FLAVONOIDES Y EFECTO ANTIPLAQUETARIO

**Tesis Doctoral presentada por
CAROLINA MANTECÓN RAMIRO**

Tutor:

Prof^a.Dra. LUCINDA VILLAESCUSA CASTILLO

Director/a:

Prof. Dr. JORGE MONSERRAT SANZ

Dra. CRISTINA ZARAGOZÁ ARNÁEZ

Alcalá de Henares, 2017



Universidad
de Alcalá

Dr. D. Pedro de la Villa Polo, Coordinador de la Comisión Académica del Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud.

INFORMA que la Tesis Doctoral titulada **INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA DE PRODUCTOS NATURALES: FLAVONOIDES Y EFECTO ANTIPLAQUETARIO**, presentada por Dña. **CAROLINA MANTECÓN RAMIRO**, bajo la dirección del Dr. D. Jorge Monserrat Sanz y de la Dra. Dña. Cristina Zaragozá Arnáez, reúne los requisitos científicos de originalidad y rigor metodológicos para ser defendida ante un tribunal. Esta Comisión ha tenido también en cuenta la evaluación positiva anual del doctorando, habiendo obtenido las correspondientes competencias establecidas en el Programa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 5 de junio de 2017.



Pedro de la Villa

Fdo.: Pedro de la Villa Polo

Dña. Lucinda Villaescusa Castillo, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Alcalá, D. Jorge Monserrat Sanz, Profesor Titular del Departamento de Medicina y Dña. Cristina Zaragoza Arnáez, Dra. en Farmacia, del Departamento de Ciencias Biomédicas, en calidad de Tutora y Directores, respectivamente,

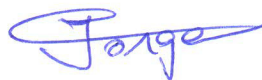
CERTIFICAN:

Que Dña. Carolina Mantecón Ramiro, Licenciada en Farmacia por la Universidad de Alcalá, ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Alcalá la Tesis Doctoral titulada: "Investigación farmacológica de productos naturales: flavonoides y efecto antiplaquetario", la cual reúne los requisitos necesarios para su defensa.

Para que así conste y surta los efectos oportunos, se firma el presente informe en Alcalá de Henares a 2 de junio de 2017.



Fdo.: Lucinda Villaescusa Castillo
(Tutora)



Fdo.: Jorge Monserrat Sanz
(Director)



Fdo.: Cristina Zaragoza Arnáez
(Codirectora)



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a los Profesores Jorge Monserrat y Lucinda Villaescusa por su paciencia, dedicación, criterio y aliento. Ha sido un privilegio poder contar con su guía, su ayuda y su amistad.

Gracias a la Dra. Cristina Zaragozá, compañera y amiga, por su valiosa ayuda en la realización de este trabajo y por su gran apoyo.

Quiero agradecer especialmente al Profesor Francisco Zaragozá el haberme dado la oportunidad de formar parte de la Unidad Docente Farmacología del Departamento de Ciencias Biomédicas. Por la orientación y ayuda que siempre me ha brindado en lo profesional y, por extensión, en lo personal.

A la Profesora Teresa Martín, por sus enseñanzas y, sobre todo, por su amistad y optimismo.

Gracias a todos los miembros del Departamento de Ciencias Biomédicas, Unidad Docente Farmacología que también han contribuido a la elaboración de este trabajo.

A todas las personas de la Universidad de Alcalá por su atención y amabilidad en todo lo referente a mi vida como alumna de Licenciatura y de Doctorado.

A mis amigos, por su insistencia y palabras de ánimo que me han ayudado a culminar este trabajo.

Finalmente, quiero agradecer y dedicar esta tesis a mi familia y en especial a mis padres.

A todos, muchas gracias.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

5-HETE: Ácido 5-hidroxieicosatetraenoico
AA: Ácido araquidónico
AAS: Ácido acetilsalicílico
ABP: Proteína ligada a la actina
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADP: Adenosina difosfato
AHA: American Heart Association
AT II: Angiotensina II
AT III: Antitrombina III
ATP: Adenosina trifosfato
BHE: Barrera hematoencefálica
CE: Células endoteliales
CMLV: Células musculares lisas vasculares
COX: Ciclooxygenasa
DAG: Diacilglicerol
DM: Diabetes Mellitus
DPI: Dipiridamol
EDFH: Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDFR: Factor relajante derivado del endotelio
EGF: Factor de crecimiento epidérmico
EPI: Adrenalina
EPO: Endoperóxidos
ET: Endotelina
FAP: Factor activador de plaquetas
FGFb: Factor de crecimiento fibroblástico
FIB: Fibrinógeno
FP4: Factor antiplaquetario 4
FT: Factor tisular
fvW: Factor de von Willebrand
GP: Glicoproteína
GTP: Guanosina trifosfato
HO-1: Hemo oxigenasa-1
HTA: Hipertensión arterial
HTB: Ácido 3-hidroxi-4-trifluoro-metilbenzoico
ICAM: Moléculas de adhesión intracelulares

ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular-1
IFN- γ : Interferón γ
Ig: Inmunoglobulina
IL-1: Interleucina 1
iNOS: Enzima óxido nítrico sintasa inducible
IP₃: Inositol 1,4,5-trifosfato
LDL: Lipoproteínas de baja densidad
LDLox: Lipoproteínas de baja densidad oxidadas
LOX: Lipooxigenasa
LPS: Lipopolisacárido
LT: Leucotrienos
MCP-1: Proteína 1 quimiotáctica de monocitos
MIDAS: Adhesión dependiente de ión metálico
MIP-1 α : Proteína inflamatoria de los macrófagos
MK: Megacariocitos
NF- κ B: Factor nuclear κ B
NK: Células natural killer
NO: Óxido nítrico
OATP1A2: Transportador orgánico polipeptídico de aniones de intestino humano
PAR: Receptores de proteasa activada
PDE3: Fosfodiesterasa 3
PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PECAM-1: Molécula de adhesión celular plaqueta endotelio-1
PF3: Factor plaquetario 3
PG: Prostaglandinas
PGE₂: Prostaglandina E₂
PGI₂: Prostaglandina I₂, prostaciclina
PI3K: Fosfoinositol 3-cinasa
PIP₂: Fosfatidilinositol-4,5 bifosfato
PKC: Proteín cinasa C
PLA₂: Fosfolipasa A₂
PLC: Fosfolipasa C
PMNN: Neutrófilos polimorfonucleares
PP4: Proteína placentaria 4
RCV: Riesgo cardiovascular
RGD: Secuencia de aminoácidos Arg-Glu-Asp
RGDS: Secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp-Ser
SCA: Sistema canalicular abierto
SNC: Sistema nervioso central

SVP: Sistema venoso profundo
SVS: Sistema venoso superficial
TGF β : Factor de crecimiento transformante β
THR: Trombina
TNF- α : Factor de necrosis tumoral α
t-PA: Factor activador tisular del plasminógeno
TXA₂: Tromboxano A₂
VAC: Proteína anticoagulante vascular
VCAM-1: Molécula de adhesión celular vascular-1
VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. REVISIÓN DE CONOCIMIENTOS	4
2.1. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS: LA NATURALEZA COMO FUENTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS.	4
2.1.1. FLAVONOIDES	5
2.1.1.1. NARINGENINA	8
2.1.1.2. NARINGINA	10
2.1.1.3. DIOSMETINA	12
2.1.1.4. DIOSMINA	12
2.1.1.5. QUERCETINA	14
2.1.1.6. RUTINA	15
2.2. AGREGACIÓN PLAQUETARIA	16
2.2.1. PLAQUETAS	16
2.2.3. RECEPTORES PLAQUETARIOS	19
2.2.4. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA	22
2.2.5. FISIOPATOLOGÍA DE LAS PLAQUETAS	28
2.2.5.1. TROMBOSIS	29
2.2.5.2. PLAQUETAS E INFLAMACIÓN	30
2.2.6. FÁRMACOS ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS	31
2.2.6.3. ANTAGONISTAS DE ADP	40
2.2.6.4. INHIBIDORES DE TROMBINA	42
2.2.6.5. INHIBIDORES DE LA ADHESIÓN DE LAS PLAQUETAS AL FvW	43
2.2.6.6. PROSTAGLANDINAS	44
2.2.6.7. ANTAGONISTAS DEL COMPLEJO RECEPTORIAL GPIIb/IIIa	45
2.3. ENDOTELIO Y PATOLOGÍA ENDOTELIAL	51
2.3.1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR	51
2.3.2. ENDOTELIO VASCULAR	52
2.3.3. PATOLOGÍA DEL ENDOTELIO VASCULAR	53
2.3.3.1. ATROSCLEROSIS	53
2.3.3.2. INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA	56
2.4. LA INFLAMACIÓN	63
2.4.1. ALTERACIONES VASCULARES	66
2.4.2. AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR	67
2.4.3. ACONTECIMIENTOS CELULARES	68
2.4.3.1. EXTRAVASACIÓN Y FUNCIÓN FAGOCÍTICA DE LOS LEUCOCITOS	68
2.4.3.2. ADHESIÓN Y TRANSMIGRACIÓN	69
2.4.3.3. QUIMIOTAXIS Y ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA	71
2.4.3.4. FAGOCITOSIS	72
2.4.3.5. LIBERACIÓN DE PRODUCTOS LEUCOCITARIOS	73
2.4.4. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN	73
2.4.4.1. CITOQUINAS	75
2.4.4.2. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	80
2.4.4.2.1. SELECTINAS	81
2.4.4.2.2. INTEGRINAS	83
2.4.4.2.3. SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS	83

3. OBJETIVOS.....	86
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	88
4.1. MUESTRAS UTILIZADAS.....	88
4.2. EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	88
4.3. FÁRMACOS UTILIZADOS.....	88
4.4. ESTUDIO DE PLAQUETAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	89
4.4.1. REACTIVOS EMPLEADOS	90
4.4.2. ESTUDIO DE OCUPACIÓN DEL RECEPTOR GPIIb/IIIa	92
4.5. ESTUDIO DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS.....	97
4.5.1. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	98
4.5.2. PROCEDIMIENTO	98
4.5.3 REACCIÓN INMUNO-ENZIMÁTICA	99
4.6. ESTADÍSTICA	100
5. RESULTADOS	102
5.1. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN	102
5.1.1. OCUPACIÓN DEL RECEPTOR GPIIB/IIIA POR EPTIFIBATIDA UTILIZANDO COMO DISOLVENTES DIFERENTES MEZCLAS HIDROALCOHÓLICAS	103
5.1.2. OCUPACIÓN DEL RECEPTOR GPIIB/IIIA EN PRESENCIA DE DIOSMINA Y QUERCETINA UTILIZANDO COMO DISOLVENTES DIFERENTES MEZCLAS HIDROALCOHÓLICAS	104
5.2. ESTUDIOS DE OCUPACIÓN DEL RECEPTOR GPIIb/IIIa.....	105
5.3. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA	109
5.3.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES PLAQUETARIAS	110
5.3.2. EFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS PLAQUETAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE UN AGENTE PROAGREGANTE	112
5.4. EFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS ..	118
5.4.1. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 β	119
5.4.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TNF- α	123
5. DISCUSIÓN.....	131
6. CONCLUSIONES	144
7. BIBLIOGRAFIA.....	146

1. INTRODUCCIÓN

Los fármacos de naturaleza polifenólica han sufrido múltiples fluctuaciones en cuanto a su utilidad terapéutica, posiblemente a causa de su escasez de estudios clínicos plenamente convincentes.

En muchas ocasiones aparecen como si fueran una panacea solucionando diferentes problemas aparentemente alejados desde el punto de vista patológico y, en otras, marcando un interés por parte de la industria farmacéutica.

En efecto, algunos mercados farmacéuticos, como el de U.S.A., mantienen una fuerte demanda de estos productos que la industria española satisface en buena medida.

Los problemas que presentan estos fármacos para que sean reconocidos en su justa medida son variados; por una parte, van dirigidos a situaciones patológicas como la insuficiencia venosa una vez que se ha producido, de modo que, siendo optimistas, lo más que se puede determinar es una disminución de la progresión de la enfermedad, lo que entraña una gran dificultad para efectuarlo por su complejidad. Por otra parte, son compuestos poco solubles, lo que implica que hay que administrar dosis elevadas por su baja biodisponibilidad. Sin embargo a la hora de trabajar "*in vitro*" ocurre lo mismo y es preciso utilizar concentraciones tan altas que no son bien aceptadas por los investigadores que suelen emplear otros órdenes de magnitud.

Hay resultados clínicos interesantes pero erráticos. Quizás son más llamativos algunos estudios básicos de los que tenemos cierta experiencia, como por ejemplo la actividad antiagregante plaquetaria "*in vitro*" de algunos de ellos, cuya justificación constituye una buena parte de este trabajo.

Como muestra del interés que suscitan los polifenoles desde el punto de vista científico mencionaremos al etamsilato, una molécula sencilla obtenida de un colorante, el Rojo Congo, que hacia 1960 evidenció propiedades hemostáticas y fue registrado con el nombre "Hemo 141".

Los avances que sufren los medicamentos y la imposibilidad de subir los precios dieron al traste con este producto. Pero es al día de hoy cuando se han publicado unos

interesantísimos trabajos que han hecho que el etamsilato vuelva a cobrar autoridad terapéutica con fuerza.

Nada menos que está validado su uso para el tratamiento de la degeneración macular asociada a las edad (DMAE) compitiendo con los anticuerpos monoclonales. El tiempo dictaminará la consolidación de la respuesta clínica.

Pero de lo que no cabe ninguna duda es de la necesidad de investigar, desde el punto de vista molecular y empleando las modernas técnicas existentes, su mecanismo de acción, algo a lo que pretendemos contribuir con la realización de este trabajo.

2. REVISIÓN DE CONOCIMIENTOS

2.1. COMPUESTOS POLIFENÓLICOS: LA NATURALEZA COMO FUENTE DE PRINCIPIOS ACTIVOS.

Los fenoles o compuestos fenólicos son sustancias orgánicas presentes en las plantas como producto de su metabolismo secundario normal. Generalmente todos los vegetales son capaces de biosintetizar un elevado número de compuestos fenólicos, algunos de los cuales son indispensables para sus funciones fisiológicas y otros son de utilidad para defenderse ante situaciones de estrés (hídrico, luminoso, etc.). A pesar de que todos ellos presentan una estructura fenólica, núcleo aromático que contiene un grupo hidroxilo libre o sustituido, se diferencian de otros compuestos que también poseen esta estructura fenólica (monoterpenos), en su origen biosintético. Aquí nos referiremos a aquellos que se originan principalmente a través de dos rutas biosintéticas: la ruta del ácido shikímico que conduce, mediante la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina), a los ácidos cinámicos y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos y derivados, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano), y la ruta de los poliacetatos, por la cual se originan quinonas, xantonas, orcinoles, etc. Igualmente, algunos de los compuestos fenólicos se originan a través de

rutas mixtas que combinan la vía del sikimato y del acetato, es el caso por ejemplo de los flavonoides.

2.1.1. FLAVONOIDES

Los flavonoides son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza, que se originan a través de la combinación de la ruta del acetato y del sikimato, vías mediante las cuales se biosintetiza la estructura diaril-propánica (condensación de un triacetato que origina el anillo A y de un ácido cinámico que da lugar al anillo B) (Fig. 1). En la naturaleza pueden encontrarse tanto en forma libre (geninas) como combinados con azúcares mediante uniones O- y C-heterosídicas. La mayoría de ellos están constituidos por un núcleo bencénico unido a una γ -pirona, incluyendo además en distintas posiciones, C-1, C-2 ó C-3, un segundo anillo bencénico dando lugar a los neoflavonoides, flavonoides propiamente dichos o a los isoflavonoides, respectivamente.

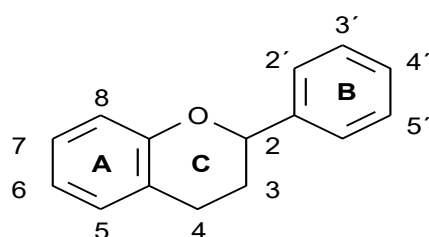


Figura 1: Estructura básica de los flavonoides

Con esta estructura existe un número elevado de compuestos distintos que pueden clasificarse en función del grado de oxidación del anillo piránico central. Así, se distinguen flavonas, flavonoles, flavanonas, chalconas, etc. (Fig. 2).

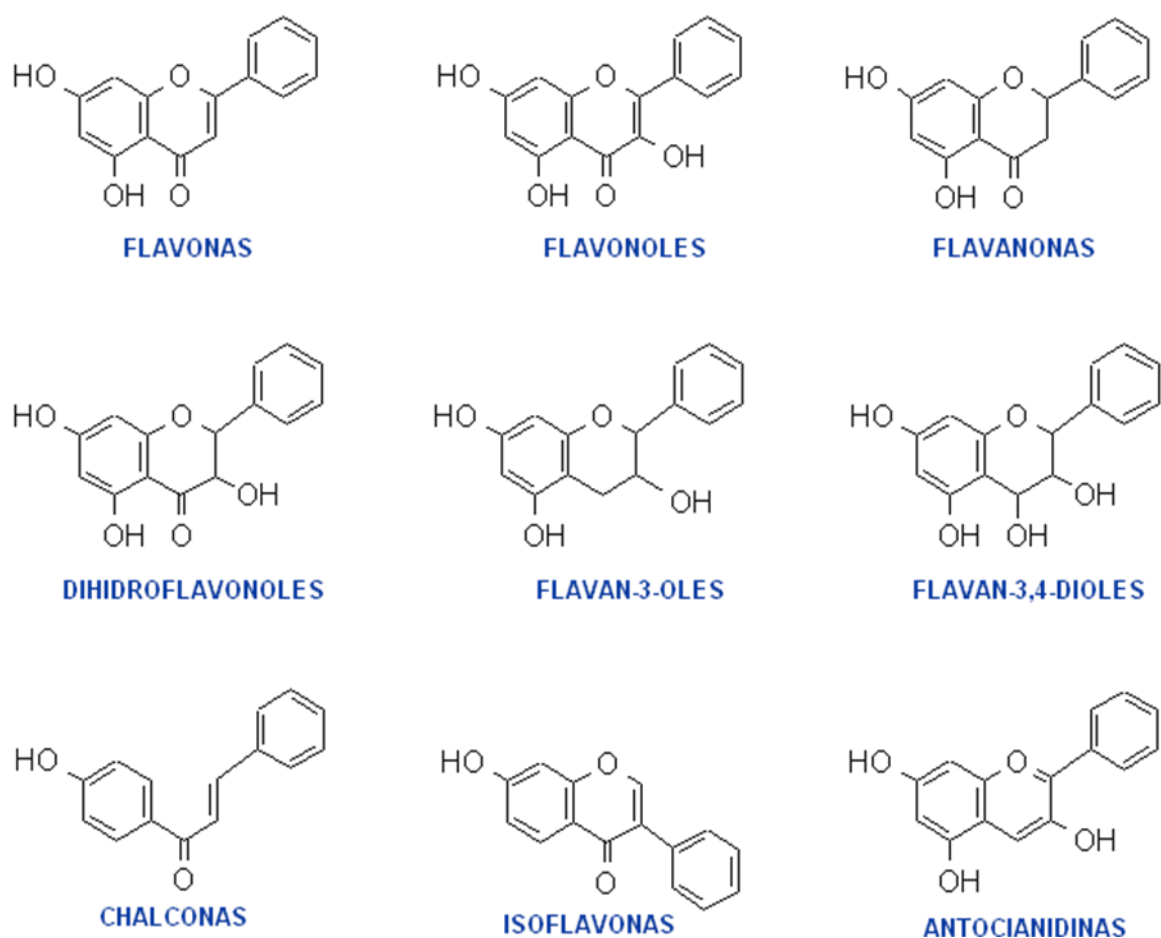


Figura 2: Estructura química de flavonoides y derivados

La distribución de flavonas y flavonoles y de sus heterósidos es universal, pero algunas de estas estructuras se encuentran restringidas a familias o grupos de familias concretos, de ahí su interés en términos de quimiotaxonomía; Así los flavonoides 6-O-sustituidos se encuentran frecuentemente en *Lamiaceae*, *Rutaceae* y *Asteraceae*; las 5-desoxiflavonas en *Fabaceae* y en *Myrtales* y los 2'-O-sustituidos en *Lamiaceae* y *Solanaceae*.

Los heterósidos flavónicos están constituidos por la genina flavónica y un resto azucarado. La parte osídica puede ser mono, di o trisacáridica. Los monoglicósidos se forman con hexosas (D-glucosa, D-galactosa o D-alosa), con pentosas (D-apiosa, L-arabinosa, L-ramnosa, D-xilosa) o con los ácidos D-glucurónico y D-galacturónico. La

variabilidad estructural aumenta con los heterósidos cuya parte osídica es un disacárido o un trisacárido, que puede ser lineal o ramificado.

La unión entre la genina y el azúcar puede realizarse por cualquiera de los hidroxilos fenólicos de la genina, pero en general se lleva a cabo por el hidroxilo en C-7 de las flavonas y el hidroxilo en C-3 de los flavonoles implicados.

Aunque por regla general los heterósidos son solubles en agua y alcoholes, muchos de ellos poseen una escasa hidrosolubilidad. Las geninas son, en su mayoría, solubles en disolventes orgánicos apolares. Cuando contienen al menos un grupo fenólico libre se disuelven en disoluciones alcalinas (Bruneton J, 2004).

Desde que en 1936 Szent-Giörgy pusiera de manifiesto los efectos beneficiosos de los flavonoides asociados a la vitamina C sobre la permeabilidad vascular, se les ha atribuido un amplio abanico de actividades farmacológicas que no guardan relación entre sí: propiedades antibacterianas, antivíricas, antiinflamatorias, antialérgicas, hepatoprotectoras, antiulcerosas, antiespasmódicas, diuréticas, estrogénicas, antidiarreicas, anticancerosas y antioxidantes, entre otras (Valentao P, 2006; Bruneton J, 2001; Majewska-Wiewska M, 2012).

Muchos de ellos presentan actividad sobre el sistema vascular como factores vitamínicos P (controlando la permeabilidad y la disminución de la resistencia de los capilares sanguíneos). Este es el caso del rutósido o los citroflavonoides, llamados así por haber sido aislados en especies pertenecientes al género *Citrus*.

Algunos de ellos ejercen su acción sobre el sistema vascular por sus efectos vasodilatadores y por inhibir distintos sistemas enzimáticos relacionados con la funcionalidad de los vasos (hialuronidasa, catecol-O-metiltransferasa, PDE-AMPC, PKC, etc.). Además, también presentan actividad antiagregante plaquetaria, antiinflamatoria y captadora de radicales libres.

Pero la principal actividad atribuida a los flavonoides está relacionada con su comportamiento como flebotónicos y protectores vasculares ya que son capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentar su resistencia (Catálogo de Medicamentos, 2016). La posible relación entre ambos efectos

(antiagregante y vascular) puede radicar en un mecanismo bioquímico común, como puede ser la actuación sobre algún eicosanoide.

Los flavonoides se introdujeron en terapéutica hace más de 50 años por sus propiedades vitamínicas P, antes comentadas. A principios de los años 80 se pensó que dicho efecto podría estar controlado por prostaglandinas (PG), sustancias cuya actuación se estaba estudiando en ese momento. Si las PG controlaban la permeabilidad capilar y los flavonoides la normalizaban, cabía pensar que estos fármacos podrían actuar sobre la cascada del ácido araquidónico (AA), es decir, sobre la producción de PG o tromboxanos (TX) en los fenómenos de agregación plaquetaria. Al parecer, los diferentes sustituyentes de la estructura benzopiránica son los responsables de este amplio abanico de efectos. Por ejemplo, la presencia del anillo B en posición 2 parece ser fundamental para el desarrollo del efecto antiinflamatorio (Zarzuelo A, 2006). Además, hay que tener en cuenta que en muchas ocasiones ciertas patologías, pese a manifestarse de distinta forma, son resultado de una misma alteración o por lo menos tienen en común alguno de los mecanismos que las desencadenan (Silberberg M, 2006). Ante la ausencia de justificación de su mecanismo de acción, los flavonoides cayeron en desuso hasta que en los años 80 resurgió el interés por este tipo de compuestos. Hoy en día siguen siendo un grupo de fármacos muy cuestionados debido a que su mecanismo íntimo de acción no está completamente dilucidado, y por otro lado, no se han realizado estudios clínicos contrastados que pongan de manifiesto su eficacia.

Por otra parte, existen estudios epidemiológicos que muestran una relación inversa entre el consumo diario de flavonoides y el riesgo de padecer cáncer y mortalidad por trastornos coronarios (McCullough ML, 2012).

2.1.1.1. NARINGENINA

Naringenina (4', 5, 7- trihidroxi-flavanona) (Fig. 3) se encuentra en el pericarpio de los frutos de numerosas especies del género *Citrus* (Rutaceae), siendo el fruto del naranjo amargo (*Citrus aurantium*) la principal especie productora (Catálogo de Plantas Medicinales, 2011).

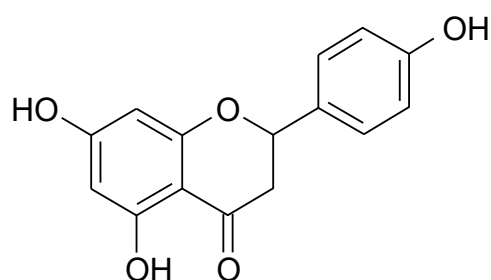


Figura 3: Estructura de naringenina

Se ha estudiado el efecto de la naringenina sobre la producción de óxido nítrico (NO) en macrófagos expuestos a un estímulo inflamatorio como es el lipopolisacárido (LPS). Los resultados indican una inhibición de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y de la expresión de ARNm, así como de la producción de NO de manera dosis dependiente. Además, naringenina inhibe la activación del factor nuclear kappaB (NF-kappa-B), que es un factor de transcripción importante para la iNOS. Los resultados de estos trabajos constituyen una aportación al estudio del efecto de la naringenina, así como de otros flavonoides relacionados, en procesos inflamatorios, ya que además, se ha demostrado su capacidad para modular la expresión de genes proinflamatorios (Tuñón MJ, 2009; Hämäläinen M, 2007).

Se ha observado igualmente la disminución de la expresión de las moléculas de adhesión celular-1 (ICAM-1) en conejos hipercolesterolémicos (Choe SC, 2001; Morin B, 2008), así como un efecto protector de células miocárdicas sobre las cuales doxorubicina (agente quimioterápico que produce cardiotoxicidad severa) induce apoptosis. Este efecto protector consiste en incrementar los niveles de hemo oxigenasa-1 (HO-1) y Bcl-2 en cardiomiocitos, así como suprimir la expresión del ARNm de caspasa-3 y de caspasa-9 (Han X, 2008; Han XZ, 2012).

También se ha evaluado, con resultados satisfactorios, el efecto supresor de naringenina sobre la proteína quimioatrayente-1 (MCP-1) y sobre el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), moléculas implicadas en la interacción entre macrófagos y adipocitos. Los resultados indican que naringenina provoca una mayor resistencia insulínica en el tejido adiposo de personas obesas (Hirai S, 2007). Estos estudios se han

realizado más recientemente con otros flavonoides obteniendo resultados similares (Hirai S, 2010).

2.1.1.2. NARINGINA

Al igual que su genina, naringina (naringenina, 7-o-rhamnoglucósido) (Fig. 4) se encuentra en el pericarpio de los frutos de especies del género *Citrus* (Rutaceae). Es una flavanona glicosilada que se extrae normalmente a partir de *Citrus paradisi* o de *Citrus aurantium*, siendo el componente responsable de su sabor amargo. También forma parte de la composición de la pulpa de algunos frutos, de hojas, flores y semillas de estas especies (Catálogo de Plantas Medicinales, 2011).

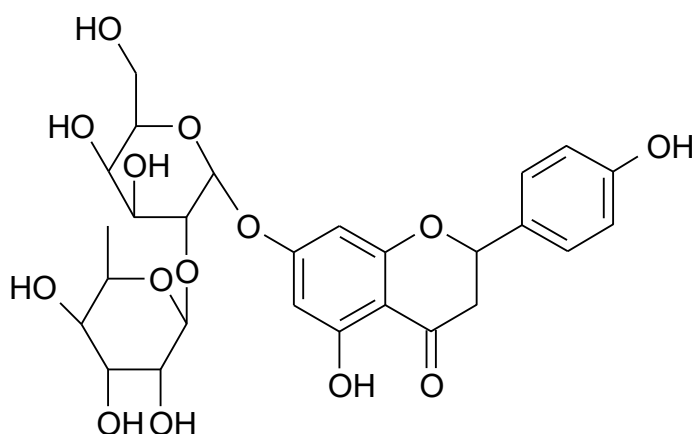


Figura 4: Estructura de naringina

Naringina es el flavonoide mayoritario en los zumos de cítricos. En el intestino se transforma rápidamente en naringenina tras hidrólisis. Ambos compuestos son capaces de inhibir el CYP3A4 y por tanto de alterar la farmacocinética de determinados fármacos como por ejemplo vinblastina, saquinavir, tamoxifeno, antihistamínicos H₁, etc. (Choi JS, 2008).

Se han llevado a cabo diferentes estudios, en relación con el efecto de la naringina presente en el zumo de pomelo, sobre el transportador OATP1A2 (polipéptido transportador de aniones orgánicos), principal transportador de fármacos en el intestino delgado. Según estos estudios, la naringina es capaz de bloquear el OATP1A2, por lo que puede reducir la eficacia de ciertos fármacos administrados por vía oral

ejerciendo por tanto un papel importante en la biodisponibilidad de los mismos (Vallejo F, 2010). El OATP1A2 se expresa en cerebro, riñón, intestino, en células de cáncer de colon y en el hepatoma humano Hep G2 (Hanley MJ, 2011). Su expresión en las células endoteliales (CE) que conforman la barrera hematoencefálica (BHE) sugiere un papel potencialmente importante en el acceso de fármacos y péptidos neuroactivos al sistema nervioso central (SNC) (Obaidat A, 2011). Por otra parte, se han llevado a cabo estudios que demuestran que naringina posee características de seguridad y especificidad adecuadas para ser considerado un inhibidor clínico específico de dicho transportador (Bailey DG, 2007).

También se han investigado los efectos beneficiosos relacionados con su acción antioxidante (Prabu SM, 2011). Los resultados muestran que esta flavanona es capaz de reducir los efectos genotóxicos producidos por bleomicina, y de incrementar el número de células supervivientes, actuando como agente quimioprotector en determinadas situaciones patológicas (Jagetia A, 2007).

Naringina posee efectos bacteriostáticos *in vitro* sobre diversos patógenos que crecen en la mucosa oral, tales como *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* (Tsui WW, 2008).

En estudios en ratas se ha observado que este flavonoide ejerce un efecto positivo en la prevención de la disfunción mitocondrial que se produce en infarto de miocardio inducido por isoproterenol, restableciendo los parámetros bioquímicos y la función mitocondrial (Rajadurai M, 2007).

Por otra parte, en estudios *in vitro*, naringina ha mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento de la osteoporosis inducida por ácido retinoico (Swarnkar G, 2011). Este hecho se ha estudiado igualmente en ratas, detectándose una disminución de la fosfatasa alcalina y un aumento en la densidad ósea en fémur, así como de su longitud y diámetro, comparado con las ratas control (Wei M, 2007).

Mediante estudios de *patch-clamp* se ha podido comprobar que naringenina prolonga la conductancia de canales de Ca^{2+} activados en miocitos, de forma dosis-dependiente. Esto podría sugerir un potencial efecto vasorrelajante (Saponara S, 2006). Este efecto

vasorrelajante se ha comprobado a su vez en estómago aislado de ratón (Amira S, 2008).

2.1.1.3. DIOSMETINA

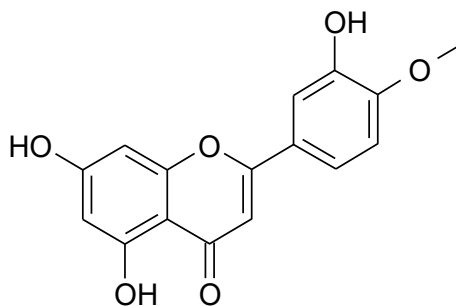


Figura 5: Estructura de diosmetina

Diosmetina (3',5,7-trihidroxi,4'-metoxiflavona) (Fig. 5) es la genina de diosmina y, como tal, no figura en la formulación de ningún medicamento en España.

Diosmetina ha sido objeto de estudio en algunos trabajos publicados y, entre sus actividades farmacológicas se puede mencionar su capacidad inhibidora de la 5'-nucleotidasa (Kavutcu M y Melzig MF, 1999), actividad antimicrobiana (Meng JC *et al.*, 2000; Bae EA *et al.*, 1999), inhibición del citocromo P-450 (Quintieri L *et al.*, 2011), prevención de la peroxidación lipídica en tejidos oculares de mamíferos, por su posible capacidad captadora de radicales libres (Ueda T *et al.*, 1996), capacidad antiinflamatoria (Wang BS *et al.*, 2012), actividad antidiabética (Stevcof G *et al.*, 2011) y un efecto inhibidor de la proliferación celular en cáncer de mama (Androustopoulos VP *et al.*, 2009).

2.1.1.4 DIOSMINA

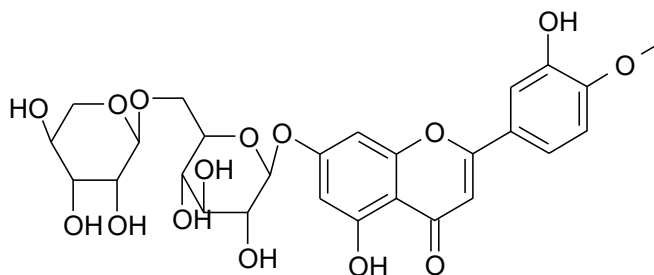


Figura 6: Estructura de diosmina

La diosmina (3,5-dihidroxi, 4'-metoxi, 7-O-rutósido) (Fig.6) es una flavona presente en las hojas del buchú (*Barosma spp*, Rutaceae) y en el hisopo (*Hyssopus officinalis L*, Lamiaceae), aunque se obtiene por semisíntesis mediante deshidrogenación a partir de hesperidina (Evans WC, 1989). Se prescribe como vasoprotector y antivaricoso y aparece como principio activo en diferentes medicamentos como Daflón®. Diosmina constituye el 90% de la fracción flavónica micronizada y purificada de Daflón® 500 mg (Catálogo de Medicamentos, 2016).

La micronización mejora la biodisponibilidad de los productos poco solubles, como es el caso de diosmina. En Daflón® 500 mg las partículas son menores de 2 micras, y esto se traduce en una acción mayor y más rápida (Amiel M y Barbe R, 1998; Chaumel JC, 1998). En diversos ensayos clínicos se ha puesto de manifiesto su eficacia y seguridad en el tratamiento del linfedema (Ramelet AA, 2000; Pecking AP *et al.*, 1997; Pecking, 1995), de los síndromes premenstruales (Sefarty D y Magneron AC, 1997) y de las crisis hemorroidales en embarazadas (Buckshee K *et al.*, 1997). Además, disminuye la respuesta inflamatoria (Frick RW, 2000; Crespo ME *et al.*, 1999), así como la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de neutrófilos y monocitos (Frick RW, 2000; Shoab SS *et al.*, 2000; Smith CR, 1999). Además, la diosmina se ha relacionado con una reducción de la liberación de factores de crecimiento (Frick RW, 2000), de la fragilidad y permeabilidad capilar (Frick RW, 2000; Ramelet AA, 2000) y de la aparición de úlceras en los miembros inferiores (Struckmann JR, 1999; Guilhout JJ *et al.*, 1997). Existen estudios que evidencian el aumento del tono vascular en venas, sanas y varicosas, ya que potencia la contracción provocada por noradrenalina (Juteau N *et al.*, 1995). En modelos experimentales, la fracción purificada y micronizada de diosmina actúa como antioxidante frente a sustancias que inducen inflamación (Melin AM *et al.*, 1996), disminuye la migración de leucocitos en músculo estriado tras reperusión post-isquémica (Pickelmann S *et al.*, 1999; Korthuis RJ y Gute DC, 1999; Korthuis RJ y Gute DC, 1997) así como la respuesta inflamatoria y la producción de malonil-dialdehído (MDA) y tromboxano B₄ (TXB₄) (Crespo ME *et al.*, 1999). También inhibe la citotoxicidad endotelial producida por LPS (Melzig MF y Loose R, 1999).

2.1.1.5. QUERCETINA

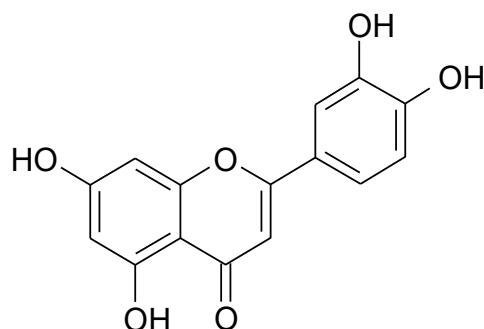


Figura 7: Estructura de quercetina

La quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) (Fig.7) constituye la genina del heterósido rutina. Aparece ampliamente distribuida en la naturaleza y se encuentra como tal en las hojas de gayuba (*Arctostaphylos uva-ursi*, Ericaceae) y en el bulbo de escila (*Urginea marítima*, Liliaceae), donde aparece en forma de heterósido (Evans WC, 1989).

Es el flavonoide más abundante en la dieta y el más estudiado como herramienta farmacológica. Entre sus múltiples propiedades cabe destacar el efecto inhibitor sobre la proteínquinasa (PKC) (Middelton E et al., 2000; Formica JV y Regelson W, 1995; Ferricola PC et al., 1989), su mayor capacidad inhibitoria de la enzima lipooxigenasa (LOX) y menos sobre la ciclooxigenasa (COX) (Middelton E et al., 2000), actividad antiinflamatoria (Middelton et al., 2000; Yu PX et al., 2013; Indra MR et al., 2013; Endale M et al., 2013), antiagregante plaquetaria (Cook NC y Sammam S, 1996; Yu PX et al., 2013), actividad antivírica (Middelton E et al., 2000; Gonzalez O et al., 2009), antineoplásica (Middelton E et al., 2000; Lin JN et al., 2013; Lyn YC et al., 2013), y antioxidante (Middelton et al., 2000; Meyers KJ et al., 2008; Annapurna A et al., 2009; Yao Y et al., 2010).

2.1.1.6. RUTINA

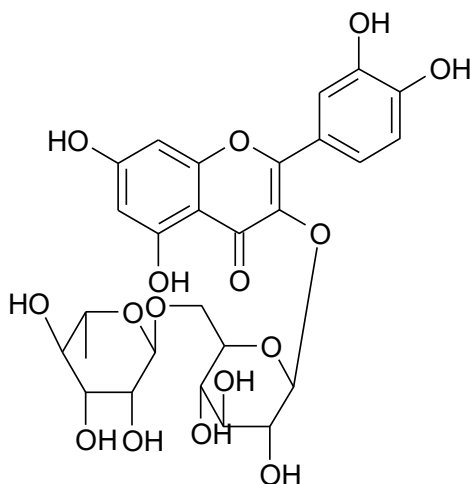


Figura 8: Estructura de rutina

Es el 3-ramnoglucósido de quercetina (Fig.8) y aparece ampliamente distribuido en la naturaleza, como citroflavonoide, en distintas especies del género *Eucaliptus* (fundamentalmente en *Eucaliptus macrorryncha*, Mirtaceae), en la sofora (*Sophora japonica* L., Fabaceae), trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*, Polygonaceae) y en el sauco (*Sambucus nigra*, Adoxaceae) (Evans WC, 1989).

En estudios de agregación plaquetaria *in vivo*, se ha puesto de manifiesto su eficacia como agente antilaquetario y antitrombótico (Formica JV y Regelson W, 1995; Gryglewski RJ *et al.*, 1987), si bien su escasa solubilidad en medio acuoso y su condición de heterósido condicionan su comportamiento en los ensayos *in vitro*, en los que se muestra como un escaso inhibidor de la agregación plaquetaria (Formica JV y Regelson W, 1995; Gryglewski RJ *et al.*, 1987). Por otra parte, se ha discutido su capacidad antiinflamatoria (Gao M *et al.*, 2013; Lee W *et al.*, 2012), así como efectos protectores tanto sobre las lesiones gástricas inducidas por etanol (La Casa C *et al.*, 2000; Liu Y *et al.*, 2013) como sobre las membranas de las células renales (Yokozawa T *et al.*, 1999). Inhibe la enzima piruvato quinasa citosólica (Smith CR *et al.*, 2000), la peroxidación no enzimática de lípidos (Muller K *et al.*, 1998), y actúa como agente quelante, antioxidante e inotrópico positivo, aunque estos dos últimos efectos son menores que los mostrados por su genina quercetina (Castillo J *et al.*, 2000). Recientemente se ha publicado su efecto citotóxico *in vitro* sobre células SW480, así

como su efecto antitumoral *in vivo*. Además, se ha comprobado que carece de efectos tóxicos en ratones portadores del tumor SW480 y ejerce propiedades antiangiogénicas (Alonso-Castro AJ *et al.*, 2013).

2.2. AGREGACIÓN PLAQUETARIA

2.2.1. PLAQUETAS

Las plaquetas fueron los últimos elementos formes de la sangre en ser descubiertos. Varias circunstancias retrasaron su hallazgo, entre ellas, su tamaño notablemente más pequeño que el de eritrocitos y leucocitos, así como las limitaciones ópticas de los primitivos microscopios empleados durante los siglos pasados.

En el siglo XIX numerosos observadores descubrieron la presencia en sangre de corpúsculos más pequeños que los glóbulos rojos y los glóbulos blancos. En 1882 Giulio Bizzozero detectó la presencia de estos pequeños elementos circulantes formando parte del tapón hemostático. Sin embargo, no se ha alcanzado una apreciación plena de su arquitectura intracelular hasta el desarrollo de la microscopía electrónica (Raúl I, 1997).

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la naturaleza multifuncional de las plaquetas, que incluye hemostasia, trombosis, inflamación y progresión tumoral (Troxler M, 2007). El conocimiento del papel fundamental de las plaquetas en la hemostasia y la definición de los desórdenes originados por una funcionalidad inadecuada de las mismas, ha dado lugar al desarrollo de nuevos tratamientos de elevada importancia en la terapia de las enfermedades trombóticas.

Las plaquetas se forman en la médula ósea a partir de los megacariocitos, mediante fragmentación citoplasmática de los mismos (Kenneth K. 2008). Tras abandonar la médula ósea, el bazo secuestra cerca de un tercio de las plaquetas que pasan a la sangre. La cifra normal de plaquetas circulantes oscila entre las 150000-300000 plaquetas/ μ litro. La mayoría de ellas son eliminadas por los fagocitos tras una vida media de diez días; sin embargo, una pequeña fracción sufre un recambio continuo

debido a su implicación en el mantenimiento de la hemostasia, siendo las plaquetas jóvenes las que poseen una mayor capacidad funcional.

Las plaquetas poseen muchas características propias de las células completas, aunque carezcan de núcleo y no puedan reproducirse. En su citoplasma podemos encontrar factores activos como actina y miosina, semejantes a las de células musculares, así como otra proteína contráctil, la trombostenina. Aparecen también residuos del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi, que sintetizan diferentes enzimas y almacenan grandes cantidades de Ca^{2+} . Entre los sistemas enzimáticos, se encuentran los encargados de la formación de adenosina difosfato (ADP), adenosina trifosfato (ATP) y PG, que desencadenan varios tipos de reacciones vasculares y tisulares, implicadas en el fenómeno de la hemostasia.

Además, las plaquetas poseen diversas estructuras secretoras (gránulos α , lisosomas y gránulos densos) de especial importancia en las fases finales del proceso de agregación (Hartwig JH, 2006).

2.2.2. CITOESQUELETO PLAQUETARIO

En estado de reposo las plaquetas tienen forma discoidal, con unas dimensiones de 0.5-3 μm de diámetro. La superficie característica de la plaqueta se ve interrumpida por invaginaciones periódicas, que dan lugar al sistema canalicular abierto (SCA).

Cada plaqueta está constituida por un ensamblaje de múltiples capas de citoesqueleto. El componente mayoritario de éste es la actina, organizada en una red de filamentos en el citoplasma de la plaqueta (citoesqueleto de actina), que le proporciona resistencia y le confiere forma discoidal. El recambio de estos filamentos es lento y son relativamente estables, ya que en reposo sus terminaciones de ensamblaje están coronadas por la proteína capZ, mientras que la colofilina, proteína encargada de la desorganización del andamiaje, permanece inactiva (Hartwig *et al.*, 1999). Los filamentos se distribuyen en espiral, desde el centro de la plaqueta hacia los márgenes celulares, donde giran y discurren de forma paralela a la membrana plasmática.

Existen otras dos estructuras especializadas en este citoesqueleto. La primera es un tirabuzón de microtúbulos consistente en un único microtúbulo girado sobre sí mismo

de 8 a 12 veces, que se dispone a unos 90 nm por debajo de la membrana plasmática, a lo largo del margen del disco. La segunda estructura consiste en la membrana de espectrina, que tapiza la cara citoplasmática de la membrana plaquetaria y los compartimentos exteriores del SCA. Las hebras bipolares tetraméricas de espectrina se interconectan en una red, utilizando las terminaciones de los filamentos de actina próximos a la membrana.

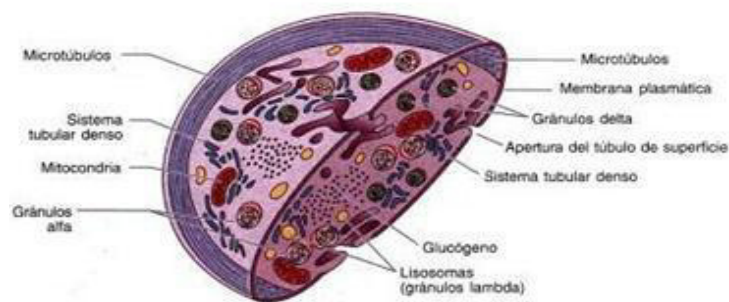


Figura 9: Estructura de la plaqueta (Páramo JA, 2007)

Los filamentos de actina también establecen uniones directas con las glucoproteínas (GP) de membrana, destacando la unión que se produce con el dominio citoplasmático de la cadena $Ib\alpha$ del receptor para el factor de von Willebrand (fvW), complejo GP Ib-V-IX, y la proteína filamina A (también llamada ABP-280) esencial para la normal funcionalidad y morfología de la plaqueta (Nakamura F, 2006).

La interacción de los tres elementos, citoesqueleto de actina, estructura microtubular y membrana de espectrina, proporciona una serie de características al citoesqueleto plaquetario, entre las que destaca la gran estabilidad de la membrana plasmática, debido a una mayor densidad del receptor para el fvW en la superficie celular, unido a los filamentos de actina subyacentes. De esta forma, los receptores permanecen alineados en la superficie celular en reposo. Se ha detectado la asociación de, al menos, otros dos receptores plaquetarios al receptor de von Willebrand ($Fc\gamma RIIA\gamma$ y $\alpha_{2b}\beta_3$); esto implica que los principales receptores de la plaqueta forman complejos lineales en la superficie, fomentándose la cooperación entre ellos. Por otro lado, el

complejo actina-receptor fvW-filamina A, pasa a través de los poros de la red de espectrina, restringiendo la expansión de la misma. Además, mantiene los filamentos cortos de actina en la membrana plasmática, para servir de núcleos de ensamblaje de actina en la formación de filópodos y lamelas (pseudópodos), tras la activación de las plaquetas (Hartwig JH, 2006).

Para dar lugar a las plaquetas en reposo, los megacariocitos (MK) deben reproducir detalladamente la arquitectura del complejo esqueleto plaquetario en su citoplasma. Diversos trabajos han aportado una nueva visión del proceso desarrollado, que implica la formación de una banda marginal de microtúbulos, el ensamblaje de la membrana de espectrina y la creación de la elaborada red de uniones de los filamentos de actina citoplasmáticos. El citoesqueleto también se encarga de mantener la estructura de la plaqueta madura y participa en la retracción del coágulo de fibrina. Además, se ha puesto de manifiesto el papel crucial que el citoesqueleto desempeña en la transducción de señales intraplaquetarias mediante proteínas fosforiladas por proteínquinas, que actúan como segundos mensajeros (Fox JE, 1993; Schulze H, 2005).

2.2.3. RECEPTORES PLAQUETARIOS

En la superficie de la plaqueta existe una gran variedad de receptores de membrana a los que se unen numerosos agonistas y proteínas de adhesión que van a determinar la activación plaquetaria. La mayoría de estos receptores pertenecen a la familia de las integrinas, receptores de adhesión presentes en varios tipos celulares.

Las integrinas son receptores transmembrana, cuya activación tiene lugar mediante dos tipos de señalización, una de ellas desde el dominio citoplasmático al dominio extracelular (*inside-out*), tras la cual se produce un cambio conformacional en el receptor, que conlleva un aumento de la afinidad por sus ligandos. Por otra parte, la ocupación del receptor por el ligando da lugar a otra vía de señalización a través de la membrana (*outside-in*), induciendo el reclutamiento de moléculas de señalización y la reestructuración del citoesqueleto (Calvete JJ, 2004).

El receptor tipo integrina de mayor importancia en la superficie de la plaqueta es el GPIIb/IIIa, también llamado $\alpha_2\beta_3$. Se estima la existencia de 50000-80000 copias de esta proteína por plaqueta (Ferguson JJ y Zaqq M, 1999). Esta integrina se encuentra entre las primeras identificadas, purificadas y clonadas. Fue la primera expresada totalmente de forma recombinante (George JN, 2000). Es un complejo heterodimérico dependiente de cationes (Ginsberg MH *et al.*, 1995), (Bennett JS, 2005), formado por dos glucoproteínas de membrana tipo I. La subunidad α_{Iib} está constituida por una cadena pesada (GPIIba-125kDa) y una ligera (GPIIbb-25kDa), unidas por un puente disulfuro. La subunidad β_3 (95kDa) está formada por 762 aminoácidos. La asociación estable entre α_{Iib} y β_3 está mediada por la interacción de las regiones amino terminal de ambas subunidades (Bennett JS, 2005).

La proteína GPIIb/IIIa se comporta como receptor para diferentes proteínas de adhesión que contengan la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD), entre ellas fvW, fibronectina, vitronectina y, principalmente fibrinógeno, uniéndose a estos ligandos con una afinidad variable. Esta propiedad típica de las integrinas es crítica en GPIIb/IIIa y, probablemente, sea consecuencia de los cambios conformacionales producidos en su dominio extracelular durante la activación de la plaquetas para desempeñar su función de receptor (Bennett JS, 2005). En la superficie de las plaquetas no estimuladas este receptor se encuentra en estado inactivo. En dicho estado puede mediar la adhesión de las plaquetas como resultado de la unión a fibrinógeno inmovilizado, mediante el mecanismo de transducción de señales *outside-in*, que induce la estimulación plaquetaria. Tras la estimulación plaquetaria se produce el cambio conformacional del receptor, a través de señales *inside-out*, poniéndose de manifiesto los sitios de unión para fibrinógeno o el fvW soluble y mediando la agregación plaquetaria. (Law DA *et al.*, 1999), (Gibbins JM, 2004). Entre los agonistas plaquetarios que inducen cambios en el receptor se encuentran ADP, trombina, adrenalina, PG, TXA_2 , serotonina (5-HT), factor de activación plaquetario (PAF), o proteínas inmovilizadas en la matriz subendotelial, como colágeno y el fvW. Además, la unión del ligando al receptor GPIIb/IIIa, induce un cambio adicional en la conformación del complejo del receptor, originando nuevos

sitios de unión inducidos por ligando (Calderwood DA 2004), (Calderwood DA *et al.*, 2000).

Otros miembros de la familia de las integrinas que actúan como receptores para colágeno, incluyen $\alpha_2\beta_1$ (también llamado VLA2, Very Late Activating Antigen o GPIa/IIa), implicado en la adhesión inicial de las plaquetas a la matriz subendotelial, y GPIc/IIa.

La integrina $\alpha_2\beta_1$ fue el primer receptor plaquetario para colágeno identificado. Se une a colágeno de forma dependiente de Mg^{2+} (Santoro SA, 1991; Saelman *et al.*, 1994). Esta integrina no estimula de manera directa la actividad tirosina kinasa, requerida para la activación plaquetaria inducida por colágeno. El modelo de activación plaquetaria propuesto consiste en dos pasos, una estabilización de las interacciones con colágeno a través de la integrina $\alpha_2\beta_1$, que permitiría la interacción con un segundo receptor de colágeno, el cual activaría la señalización vía tirosin kinasa (Calderwood DA, 2004).

Al igual que ocurre con otras integrinas, la afinidad de $\alpha_2\beta_1$ por su ligando se ve aumentada mediante señales *inside-out* (Inoue *et al.*, 2003).

El segundo receptor para colágeno es la glucoproteína GPVI, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se encuentra asociado al receptor FcR γ (receptor para inmunoglobulinas asociado covalentemente a Fc ϵ RI, Fc γ RI y Fc γ RII) (Kasirer-Friede A, 2007). GPVI posee dos dominios extracelulares tipo inmunoglobulina, un centro tipo mucina, un dominio transmembrana y una cadena citoplasmática de 51 aminoácidos (Andrews RK, 2004).

La pérdida del receptor GPVI en plaquetas de ratón protege frente a la formación de trombos arteriales carotídeos en un modelo tromboembólico, mostrando la implicación del receptor en la formación de trombos debida a flujo turbulento, junto con GPIb-IX-V, que une colágeno asociado al fvW (Andrews RK, 2004).

El complejo GPIb-V-IX es un receptor no integrina para el fvW, activo de forma constitutiva. Existen unas 25000 copias del receptor en las plaquetas en reposo, y está íntimamente unido al citoesqueleto plaquetario, pudiendo decrecer el número de receptores funcionales tras la activación con trombina, debido a su internalización

(Andrews RK, 2004). Contiene el heterodímero GPIb α (143kDa) y una cadena β (22kDa) unida por puentes disulfuro y requiere la intervención de todas sus partes para ser funcional (Mhawech P, Saleem A, 2000). Origina la unión inmediata del fvW perivascular expuesto y está implicado en la adhesión de las plaquetas en diferentes etapas. También interviene en la amplificación de la respuesta plaquetaria a la trombina (Varga-Szabo D, 2008).

Tabla I: Receptores glucoproteicos de la membrana plaquetaria involucrados en la adhesión y agregación plaquetarias.

RECEPTOR	LIGANDO	ACCIÓN
<i>Integrinas</i>		
$\alpha_2\beta_1$ (Glucoproteína Ia/IIa)	Colágeno	Adhesión
$\alpha_5\beta_1$ (Glucoproteína Ic/IIa)	Fibronectina	Adhesión
$\alpha_6\beta_1$	Laminina	Adhesión
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Fibrinógeno	Agregación
$\alpha_{IIb}\beta_3$ (Glucoproteína IIb/IIIa)	Fibronectina	
	Factor von Willebrand	
	Vitronectina	
$\alpha_v\beta_3$	Vitronectina	Adhesión
	Fibrinógeno	
	Fibronectina	
	Factor von Willebrand	
<i>No integrinas</i>		
Glucoproteína Ib	Glucoproteína IV	Adhesión
Glucoproteína IV	Trombospondina	Adhesión
	Colágeno	

2.2.4. ACTIVACIÓN PLAQUETARIA

La interacción de las plaquetas con la pared vascular se desarrolla en tres etapas: adhesión, activación-secreción y agregación; durante las cuales tienen lugar interacciones entre las plaquetas y la matriz subendotelial (adhesión plaquetaria) y de las plaquetas entre sí (agregación plaquetaria). La adhesión plaquetaria no requiere actividad metabólica por parte de la plaqueta, pero es el paso inicial para desencadenar la activación de la misma.

La adhesión ocurre sobre la superficie vascular lesionada o sobre la superficie de un cuerpo extraño. Cuando la superficie vascular está lesionada, las plaquetas entran en contacto con elementos de la pared, fundamentalmente glucoproteínas que se encuentran en el subendotelio y en lesiones patológicas (Fig.10). A través de los receptores de la superficie de la plaqueta, descritos anteriormente, se establecen puentes de fijación, dando lugar a la adhesión plaquetaria. En circunstancias normales, el endotelio intacto oculta sus ligandos en el subendotelio, impidiéndoles entrar en contacto con la plaqueta.

Tras la adhesión se produce la activación de la plaqueta, proceso que es también inducido por numerosos mediadores como adrenalina, 5-HT, vasopresina, angiotensina, ADP y/o trombina. Este proceso es complejo y en él intervienen numerosas cascadas de reacciones en las que participan procesos asociados a proteínas G, fosfoinosítidos y fosfolipasas A y C. En consecuencia tiene lugar la fosforilación de proteínas, movilización de calcio endógeno y la liberación de AA que acaba convirtiéndose en TXA_2 . Todo ello provoca en la plaqueta la reorganización de proteínas citoesqueléticas, cambios morfológicos y formación de pseudópodos (Flórez J, 2008).

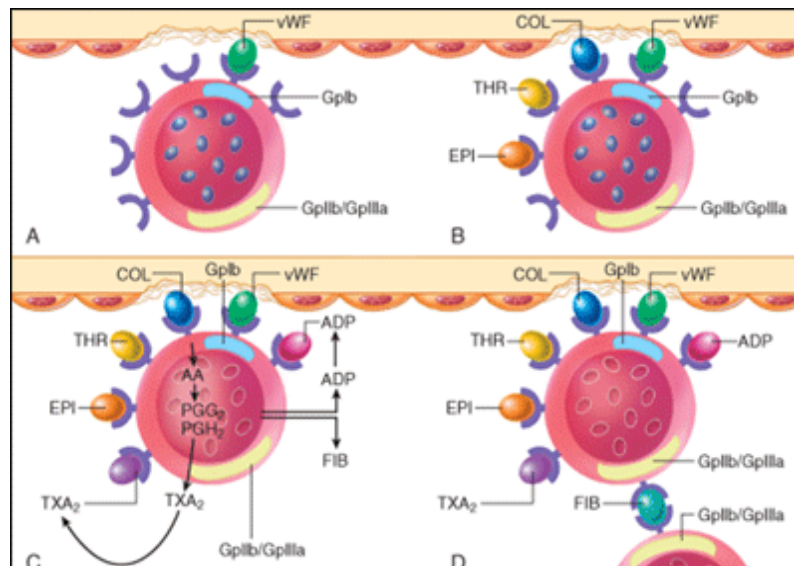


Figura 10: Secuencia de acontecimientos en la activación plaquetaria. A. La adhesión plaquetaria a la superficie íntima vascular lesionada es mediada por la fijación de factor von Willebrand (vWF) a su receptor de la membrana plaquetaria (Gp Ib). B. Las plaquetas se anclan también a la pared del vaso dañado mediante la fijación a los receptores de colágeno (COL) del colágeno subendotelial. Otros

estimulantes plaquetarios de la sangre, como trombina (THR) y adrenalina (EPI) se fijan a sus receptores respectivos. C. En respuesta a estos diferentes estímulos, las plaquetas adheridas se activan y liberan tromboxano A₂ (TXA₂) y adenosina difosfato (ADP), que se fijan a sus receptores plaquetarios respectivos y amplifican el proceso de activación. D. La agregación plaquetaria es mediada por la fijación de fibrinógeno (FIB) a sus receptores en las plaquetas circundantes, que da lugar a la formación de puentes de fibrinógeno. El receptor FIB se forma mediante el acoplamiento de Gp IIb/IIIa en la membrana de las plaquetas activadas (Braunwald E, 2006).

El fvW juega un papel central en la adhesión plaquetaria. Interacciona con el colágeno subendotelial y las plaquetas a través de diferentes dominios, dando lugar a la formación de puentes entre ambos, esenciales para la adhesión al subendotelio expuesto. Actualmente se conoce su organización funcional y estructura general gracias a la determinación de su secuencia primaria (Ruggeri ZM, 2007), la clonación de su ácido desoxirribonucleico (ADN) y la identificación de los dominios principales responsables de las actividades específicas.

El fvW es almacenado y liberado desde los gránulos α de plaquetas y cuerpos de Weibel-Palade de células endoteliales (Schmugge M, 2003). Desde las plaquetas se libera tras la estimulación con trombina y colágeno.

Está formado por una serie de polímeros de subunidades idénticas que se mantienen unidos por puentes disulfuro. El tamaño es variable, siendo los dímeros los fragmentos más pequeños excretados. Los polímeros presentes en las plaquetas poseen un tamaño superior a los circulantes. El fvW está altamente glicosilado, lo cual le confiere cierta protección frente a un ataque proteolítico, pero esta parte azucarada no parece ser necesaria para la unión a las plaquetas o al endotelio (Ruggeri ZM, 2003).

Sin embargo, el tamaño de los polímeros posee gran importancia en su eficacia hemostática, aunque no es el único factor que interviene. Los de mayor tamaño parecen ser más eficaces en la interacción de la plaqueta con el subendotelio, ya que interaccionan preferiblemente con el colágeno.

El receptor plaquetario fundamental para la adhesión mediada por el fvW es la GPIb (Ruggeri ZM, 2007). La interacción entre el complejo GPIb-V-IX y el fvW unido al colágeno, es crucial en el comienzo de la adhesión plaquetaria, siendo particularmente

importante en zonas de alto flujo/fricción (shear stress o fuerza de cizallamiento), al parecer porque en estos sitios suceden cambios en la conformación del mismo fvW y/o de la GPIb-V-IX (Andrews RK, 2003).

Junto con el fvW, el colágeno es uno de los compuestos más importantes presentes en el endotelio en el proceso de activación de la plaqueta, actuando de forma directa o indirecta con los receptores plaquetarios. La GP $\alpha_2\beta_1$ es el principal receptor implicado en la adhesión de las plaquetas a colágeno. Sin embargo, para que esta adhesión sea efectiva, es necesario que se activen también los receptores tipo integrina mediante señales *outside-in*. El colágeno es el mayor responsable de esta activación a través de la unión a la Ig GPVI. Esta unión desencadena la liberación de mediadores solubles, siendo ADP el más importante, además de TXA₂ y trombina (Nieswandt B, 2003; Sarratt KL *et al.*, 2005).

La interacción del colágeno con las plaquetas es esencial para la propagación de la adhesión, mientras que el fvW está mayoritariamente implicado en la unión inicial de las plaquetas al subendotelio (Varga-Szabo D, 2008).

Como consecuencia de los procesos anteriores y condicionando la posterior agregación plaquetaria, se producen cambios morfológicos originados por las reestructuraciones en el citoesqueleto de la plaqueta caracterizados por la esferización de la plaqueta y la emisión de pseudópodos (Siess W, 1989). Los cambios empiezan cuando la gelsoidina se activa, al incrementar la concentración citosólica de Ca²⁺. Esta proteína fragmenta los filamentos de actina, aunque la unión filamina 1-GPIb α permanece intacta. La fragmentación de actina le permite hincharse, utilizando la membrana derivada del SCA y de la secreción de gránulos (Hartwig JH *et al.*, 2006). Este proceso puede considerarse, por lo tanto, un requisito previo para la reacción de liberación de sustancias en la plaqueta.

La profunda remodelación producida en el citoesqueleto, que da lugar a la formación de pseudópodos, fortalece las uniones de la superficie plaquetaria a la matriz subendotelial e incrementa el área superficial, lo que permite a su vez la unión de nuevas plaquetas circulantes (Watson SP, 1999).

Esta primera etapa en la agregación plaquetaria, adhesión y cambio de forma, constituye la agregación reversible. Posteriormente, como consecuencia de la liberación de sustancias del contenido granular, se produce la agregación irreversible. La respuesta irreversible comprende la formación de metabolitos derivados principalmente de AA y la secreción de los constituyentes de los gránulos α , lisosomas y gránulos densos (Reed GL, 2004).

Las estructuras secretoras contienen una amplia variedad de compuestos biológicamente activos.

- **Gránulos α .** Contienen un amplio abanico de compuestos. Algunos como el fvW o el factor plaquetario 4 (FP4 o factor antiheparina) se sintetizan en los MKs. Otros como el fibrinógeno, son adquiridos del citoplasma por endocitosis mediada por receptor, mientras que otros, como la albúmina, inmunoglobulina G (IgG) y diferentes proteínas plaquetarias, son captados por pinocitosis (George JN, 2000). También contienen fibronectina, vitronectina, osteonectina, antagonista II del fvW, trombospondina (TSP), inmunoglobulina A y M (IgA e IgM), C1 inhibidor, plasminógeno, inhibidor 1 activador del plasminógeno, inhibidor de collagenasa derivada de plaquetas, quininógeno de elevado peso molecular, proteínas, α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina, α_2 -antiplasmina, multimerina, proteína básica plaquetaria, β -tromboglobulina, GP rica en histidina, proteína activadora del tejido conectivo III, proteína activadora de neutrófilos II, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de transformación del crecimiento endotelial, así como factores V y VIII. Los gránulos α son también la fuente de muchas de las citoquinas liberadas por las plaquetas (Coppinger *et al.*, 2007).
- **Lisosomas.** Contienen catepsina D y E, carboxipeptidasa A y B, prolina carboxipeptidasa, β -D-galactosidasa, α -L-fucosidasa, β -D-glucosidasa, β -D-fucosidasa, α -D-glucosidasa, fosfatasa ácida y arilsulfatasa.
- **Gránulos densos.** Contienen un depósito no metabólico de nucleótidos de adenina, ADP y ATP. El ADP, tras la exocitosis, actúa como un agonista

plaquetario sobre diferentes receptores P_2 . El ATP liberado pasa rápidamente a adenosina monofosfato (AMP) y adenosina, pero posee un papel en la activación de las plaquetas, ya que se ha encontrado un receptor para ATP en las mismas. Otro componente de estos gránulos es la 5-HT, la cual no se sintetiza en la plaqueta pero se toma activamente del plasma y se almacena formando complejos con ATP y Ca^{2+} . Tras la liberación, se comporta como un agonista débil, a través de receptores 5-HT₂. También contienen pirofosfato y Ca^{2+} . La membrana de los gránulos densos contiene diferentes enzimas, entre las que destaca una ATPasa implicada en la captación de 5-HT, una tirosina-quinasa y varias proteínas fijadoras de guanosina trifosfato (GTP) de bajo peso molecular, implicadas en el proceso de exocitosis. Además, poseen receptores de adhesión con dominios de unión lumenales, pero que pasan a expresarse en la superficie de la plaqueta tras la exocitosis, entre los que se han podido determinar GPIb y GPIIb/IIIa (Flaumenhaft R, 2003).

Para que puedan formarse rápidamente agregados plaquetares estables, es necesario que existan mecanismos que potencien la acción de los agonistas. Los metabolitos del AA formados, entre los que se incluyen PGH_2 , PGD_2 y TXA_2 , así como el ADP liberado al espacio extracelular, se unen a receptores específicos en la superficie de la plaqueta, estimulando la hidrólisis de fosfatidil-inosíoles, la movilización de Ca^{2+} , la fosforilación de proteínas y la exposición de receptores para fibrinógeno (Savage B *et al.*, 2002). La 5-HT liberada también actúa como un agonista débil, a través de receptores 5-HT₂, aunque el mecanismo de retroalimentación positivo ejercido sea de menor importancia que el de ADP y secundario a su acción vasoconstrictora, que reduce el flujo sanguíneo en el lugar de la lesión.

Los iones Ca^{2+} desempeñan un papel primordial en los procesos de activación, agregación y secreción plaquetarias. Los estímulos plaquetarios facilitan la entrada de Ca^{2+} desde el exterior y activan procesos como las fosfolipasas C y A_2 que, a su vez y a través de los correspondientes productos intermediarios, potencian la movilización de Ca^{2+} (Florez J, 2008).

Tras la activación de las plaquetas con ciertos agonistas, hay una liberación de partículas vesiculares, llamadas micropartículas plaquetarias. Estas micropartículas potencian la generación de trombina. En sus membranas se encuentran GPIb, IIb y IIIa, así como P-selectina y TSP. Tras su liberación, las micropartículas se adhieren a la matriz subendotelial y proporcionan un sustrato para la unión de las plaquetas mediado por GPIIb/IIIa (Merten *et al.*, 1999).

Las micropartículas de plaquetas constituyen aproximadamente del 70 al 90% del total de micropartículas circulantes. La capacidad de las plaquetas para dar lugar a micropartículas se conoce desde hace décadas (Wolf P, 1967). Desde entonces, se han estudiado ampliamente los mecanismos que conducen a la formación de estas micropartículas así como su implicación en diversas patologías. El aumento de la concentración de Ca^{2+} es uno de los factores que inducen la producción de estas vesículas, al interaccionar con los fosfolípidos de membrana o directamente con proteínas implicadas en la formación de las micropartículas. La proteína fijadora de Ca^{2+} más estudiada que conduce a la formación de micropartículas es la proteasa calcio-dependiente calpaína. Sin embargo, además de los procesos dependientes de Ca^{2+} hay otros mecanismos que conducen a la formación de estas partículas. Por ejemplo, la desfosforilación de tirosina, fosforilación de proteínas y activación de calmodulina (Morel O, 2011).

La producción de estas micropartículas de plaqueta no tiene lugar solamente en las plaquetas activadas. Durante su maduración, las plaquetas también pueden liberar vesículas (Flaumenhaft R, 2006). El mecanismo responsable de esta liberación de micropartículas parece ser una desestabilización del esqueleto de actina inducida por la integrina GPIIb/IIIa (Morel O, 2011).

2.2.5. FISIOPATOLOGÍA DE LAS PLAQUETAS

La pérdida del equilibrio entre todos los mecanismos descritos anteriormente conduce a la aparición de cuadros patológicos, como la diátesis trombótica, arterial o venosa, según las condiciones vasculares que entren en juego. Los procesos clínicos en los que está implicada la formación de un trombo vascular son de elevada importancia.

Entre ellos se encuentran el infarto agudo de miocardio, accidentes cerebrovasculares, trombosis venosa, embolia pulmonar, etc. (Flórez J, 2008)

2.2.5.1. TROMBOSIS

La plaqueta desempeña un papel fundamental en la trombogénesis y la aterogénesis, ya que libera compuestos que inducen cambios aterogénicos en las paredes vasculares.

Es evidente la relevancia que los fenómenos trombóticos tienen en la historia de la aterosclerosis. Según Fuster (Fuster V, 2005), el daño arterial se puede clasificar en tres estadios. El primero sería un daño funcional pero no morfológico ocasionado por pequeñas alteraciones del flujo, ya sea intraluminal o del interior de la propia pared.

En un segundo paso se produce la denudación del endotelio con daño intimal, pero la lámina elástica interna se mantiene intacta. En esta fase, la agregación plaquetaria y depósito de fibrina pueden dar lugar a la formación de trombos. En un tercer y último estadio, se ven afectadas la capa íntima y la capa media. Ésta también es una lesión especialmente predispuesta a la formación del trombo, tanto intraluminal como intramural (Moreno PR *et al.*, 2006).

El centro lipídico de la placa es un lugar especialmente sensible para constituirse como la base orgánica de la formación del trombo debido a su capacidad de fijación de elementos hemostáticos (fibrinógeno y plaquetas), cuando es expuesto al flujo circulatorio, como consecuencia de la lesión y denudación del endotelio. Asimismo, la progresión rápida de una placa puede ser la consecuencia de la ruptura de una placa joven, lo que da lugar a la formación de un trombo *in situ* que, posteriormente, puede hidrolizarse total o parcialmente mediante la acción de la cascada de la fibrinólisis, o bien puede organizarse.

Cuando la formación del trombo es intraluminal y alcanza un tamaño crítico, la luz vascular se ocluye y aparecen los síndromes correspondientes a una angina inestable, un infarto de miocardio o una muerte súbita.

Si la formación de trombos no es intraluminal, sino que se desarrolla en el interior de la pared, también puede contribuir decididamente al crecimiento de la placa, agravando igualmente la estenosis arterial.

2.2.5.2. PLAQUETAS E INFLAMACIÓN

Es importante destacar la estrecha relación que las plaquetas tienen con la inflamación. La inflamación es un proceso multifactorial que implica una red de interacciones entre varios tipos celulares, incluidos neutrófilos y plaquetas. Ambos participan como células emisoras y diana de los mediadores biológicos, que se generan o liberan en los procesos inflamatorios agudos o crónicos. En los últimos años, se ha establecido que diversas moléculas quimiotácticas o espasmogénicas, principalmente asociadas a la superficie plaquetaria o contenidas en sus gránulos, regulan la capacidad de las plaquetas de mediar en los procesos inflamatorios, junto con otras células inflamatorias (McNicol A, 2008).

Entre las sustancias liberadas por las plaquetas que median en los procesos inflamatorios se pueden citar:

- **Factores de crecimiento**, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) con capacidad quimiotáctica para neutrófilos y fibroblastos; o el factor de crecimiento tumoral (TGF β), que regula los procesos de reparación y angiogénesis.
- **El PAF**, mediador fosfolipídico liberado en respuesta a numerosos estímulos, como péptidos quimiotácticos, diferentes autacoides, trombina, colágeno o el propio PAF. Posee importantes acciones proinflamatorias.
- **5-HT**, almacenada en los gránulos plaquetarios. Contribuye al proceso inflamatorio debido a su potente acción vasoconstrictora.
- **Quimiocinas** como RANTES (Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted), liberada desde los gránulos α . Es quimiotáctica para macrófagos y leucocitos al igual que el FP4, también liberado desde gránulos α .

-
- **Factores tipo citocina** (IL-1 β , ligando de CD40, β -trombomodulina). La IL-1 β se ha identificado como uno de los mayores mediadores en la activación de células endoteliales mediada por las plaquetas.
 - **Productos derivados del AA**. Intervienen en la quimiotaxis, agregación plaquetaria, secreción de enzimas lisosomales y Ca²⁺. Estos eicosanoides contribuyen a los síntomas de la inflamación en las primeras fases.

Las plaquetas, además del papel que desempeñan en la hemostasia y la trombosis, intervienen en la regulación de respuestas inflamatorias y en el desarrollo de la aterosclerosis. Un mayor conocimiento de estos procesos, así como de los mecanismos moleculares de la interacción de las plaquetas con las células endoteliales, permitirá el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas en la prevención de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (Tsoumani NE *et al.*, 2012)

2.2.6. FÁRMACOS ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS

Los fármacos inhibidores del funcionalismo plaquetario, clásicamente denominados fármacos antiagregantes plaquetarios, son un grupo de compuestos cuyo principal objetivo es evitar la activación de las plaquetas. Su acción no produce necesariamente un bloqueo de la hemostasia primaria, pero sí un enlentecimiento de la respuesta de las plaquetas circulantes ante estímulos protrombóticos. Los antiagregantes plaquetarios previenen, por tanto, la trombosis intravascular y alteran el curso de la enfermedad aterosclerótica.

Durante los últimos años se han desarrollado potentes inhibidores de la función plaquetaria, con mecanismos de acción muy diferentes, de tal manera que, en combinación, sus efectos son aditivos o incluso sinérgicos. Su disponibilidad ha conducido a una revolución de la farmacología cardiovascular, por la cual la angioplastia y la colocación de endoprótesis en lesiones vasculares es ahora factible con una baja tasa de reaparición de la estenosis y de trombosis cuando se practica una inhibición eficaz de las plaquetas (Majerus PW, 2007).

Tabla II: Clasificación de los antiagregantes plaquetarios más utilizados en terapéutica en España

INHIBIDORES DE LA COX	AAS, triflusal
ANTAGONISTAS DE ADP	ticlopidina, clopidogrel, prasugrel, ticagrelor
ANTAGONISTAS DE GPIIb/IIIa	eptifibatida, abciximab, tirofiban, lamifiban

A continuación se muestra una clasificación más completa de todos los fármacos con propiedades antiagregantes según su mecanismo de acción. Se incluyen, además de los ya mencionados, medicamentos no comercializados en España, fármacos con acción antiagregante inferior a los utilizados en terapéutica hoy en día, y medicamentos con actividad antiagregante cuya indicación principal es otra.

2.2.6.1. INHIBIDORES DE LA SÍNTESIS DE TXA₂

El prostanoide TXA₂ es un potente agregante plaquetario y vasoconstrictor, por consiguiente los fármacos que inhiben su síntesis poseen un evidente efecto antiplaquetario. Esta síntesis puede ser inhibida en diferentes pasos enzimáticos.

- Inhibidores de COX

A pesar de su inespecificidad por los prostanoideos plaquetarios, estos fármacos son los más usados en clínica.

- **Ácido acetilsalicílico (AAS).** El mecanismo de la acción antiagregante del AAS se centra en la inhibición irreversible mediante acetilación del centro activo de la COX. De esta forma se impediría tanto la síntesis de TXA₂ como de PGI₂. No obstante, se observó que la enzima plaquetaria se inhibía en mayor medida que la vascular, lo que llevó a plantearse que debía de existir una dosis que redujera suficientemente la síntesis de TXA₂ respetando al máximo la de PGI₂. Definir esta dosis constituye el denominado “dilema del AAS”.

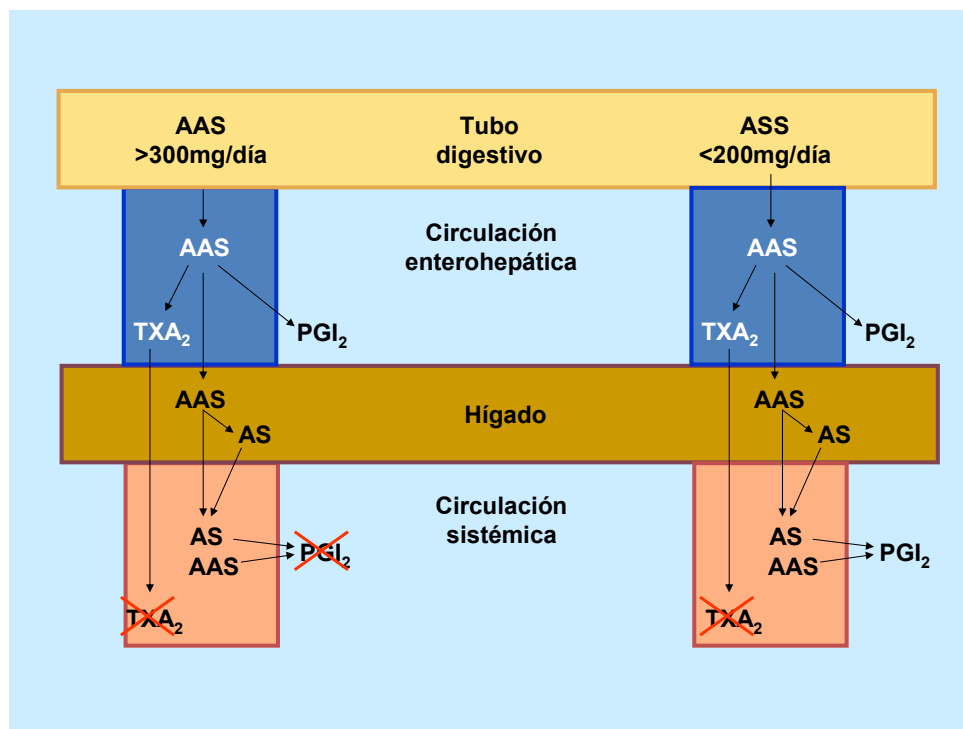


Figura 11: Esquema de la explicación cinética del dilema del ácido acetil salicílico. (De la Cruz JP, 2008)

Actualmente se acepta que la explicación de este dilema es de tipo farmacocinético (Fig. 11), hipótesis basada en el hecho de que el AAS posee en el organismo como metabolito principal al ácido salicílico, el cual se une a la COX pero no la inhibe, al menos en el intervalo de concentraciones alcanzadas en el ser humano con dosis antitrombóticas de AAS. Sin embargo compite con el AAS y evita la unión de éste a la enzima. Al administrar dosis altas de AAS (>300mg/día), en la circulación prehepática se bloquearían la COX plaquetaria y la vascular, posteriormente se ejercería un efecto de primer paso hepático, formándose una determinada proporción de ácido salicílico, pero también saldría a la circulación sistémica una cantidad suficiente de AAS sin desacetilarse como para competir con su metabolito e inhibir la COX vascular. Al administrar dosis moderadamente bajas de AAS (<150-200mg/día), no se observaría la competición en la síntesis de PGI₂, ya que en el primer paso sale suficiente ácido salicílico para impedir el bloqueo de la COX vascular. Ésta es la base de la comercialización de una forma de AAS de liberación sostenida, la cual aporta niveles bajos pero mantenidos de AAS y ácido salicílico. Además, las plaquetas no pueden sintetizar nueva enzima COX, mientras que las CE sí lo hacen. (De la Cruz JP, 2008).

Por otra parte, el AAS posee un efecto estimulante de la síntesis de NO, mediador antiagregante endógeno, lo cual puede contribuir a su efecto sobre la síntesis de TX en la inhibición del funcionalismo plaquetario.

En la actualidad, existe una cierta controversia respecto a la utilización del AAS en prevención primaria o secundaria de la enfermedad vascular isquémica. En relación con esto, podemos decir que el AAS:

- No disminuye la mortalidad global o por reinfarto en el infarto agudo de miocardio
- Disminuye la incidencia de infartos y la mortalidad en angina inestable
- Previene la oclusión de puentes aortocoronarios, tanto solo, como en combinación con dipiridamol, especialmente si se emplea antes de la cirugía o en las primeras 24 h tras ella.
- Reduce la incidencia de accidentes cerebrovasculares isquémicos, sin que aumente su eficacia al añadir otros antiagregantes.
- Previene la trombosis venosa postoperatoria.
- Administrado antes de la angioplastia coronaria, disminuye la incidencia e importancia de episodios trombóticos coronarios agudos.
- No es útil para evitar episodios tromboembólicos en pacientes con prótesis valvulares metálicas.
- Existen datos sobre su uso en prevención primaria, aunque no son concluyentes. Reduce el riesgo de infarto de miocardio en hombres y el de ictus en mujeres, pero su uso incrementa el riesgo de episodios hemorrágicos (Wolff T, 2009).
- **Triflusal.** Es un antiagregante plaquetario derivado del AAS al que se añade un trifluormetilo. Actúa inhibiendo la síntesis de prostanoïdes, mediante el bloqueo irreversible (por acetilación) de la COX de forma análoga al AAS. Sin embargo, el triflusal tiene escaso efecto sobre la COX endotelial, por lo que la síntesis de prostaciclina apenas se inhibe. Tanto triflusal como su metabolito activo (ácido 3-hidroxi-4-trifluoro-metilbenzoico o HTB) inhiben la fosfodiesterasa (PDE) plaquetaria, elevando los niveles plaquetarios de AMPc, lo que reduce la interacción entre la plaqueta y la CE (Catálogo de Medicamentos, 2016).

- **Inhibidores específicos de la tromboxano sintetasa**

La inhibición específica de la enzima tromboxano sintetasa plaquetaria es un mecanismo que bloquea la función de estas células, ya que evita la formación de un compuesto agregante y favorece la síntesis endotelial de prostaciclina, puesto que los endoperóxidos cíclicos (EP) acumulados pueden transferirse de la plaqueta al endotelio y servir de sustrato a la prostaciclina sintetasa.

- Inhibidores duales de la tromboxano sintetasa y antagonistas del receptor de TXA₂

Los fármacos que ejercen ambos mecanismos impiden la unión de TXA₂ y de los endoperóxidos cíclicos a sus receptores de membrana. Estos EP pueden transferirse al endotelio para producir prostaciclina.

- **Ridogrel.** Actualmente no está comercializado en España (Fig. 12). Es un potente inhibidor de la tromboxano-sintetasa. Reduce significativamente la formación del TXA₂ en pacientes con infarto de miocardio y tras angioplastia coronaria. A dosis altas, el ridogrel no sólo inhibe la actividad del enzima, sino que también antagoniza al receptor de TXA₂, lo que aparentemente se requiere para bloquear la actividad protrombótica de los EP que se acumulan en respuesta a la inhibición de la tromboxano-sintetasa (Meadows TA, 2007).

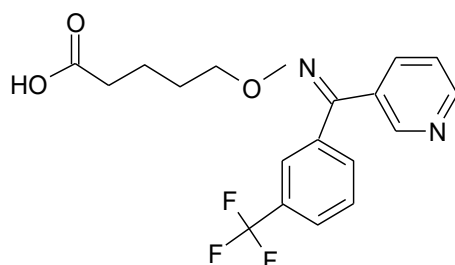


Figura 12: Estructura de ridogrel

- **Picotamida.** Actualmente no está comercializado en España. Es un inhibidor débil de la tromboxano-sintetasa y antagonista del receptor TXA₂ (Fig. 13). En la actualidad apenas se utiliza, ya que únicamente los fármacos que combinan una inhibición potente y persistente de la tromboxano-sintetasa y del receptor (Fig. 14) consiguen suprimir la actividad protrombótica (Sethi A, 2008).

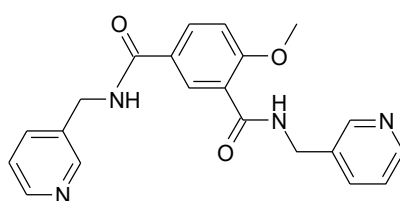


Figura 13: Estructura química de picotamida

La inhibición selectiva de la tromboxano-sintetasa (ITS) pero no de la actividad de la COX, induce a la acumulación de EP en las plaquetas activadas. En presencia de un antagonista del receptor de tromboxano/EP (ART), los EP pierden su capacidad protrombótica. Además, son convertidos por las CE y musculares lisas vasculares (CMLV) en PGI_2 en el microambiente de la pared del vaso lesionado. Por lo tanto, la combinación de ART con ITS inhibe la formación adicional del trombo y evita los efectos secundarios que limitan la acción de las prostaglandinas administradas en venoclisis sistémica.

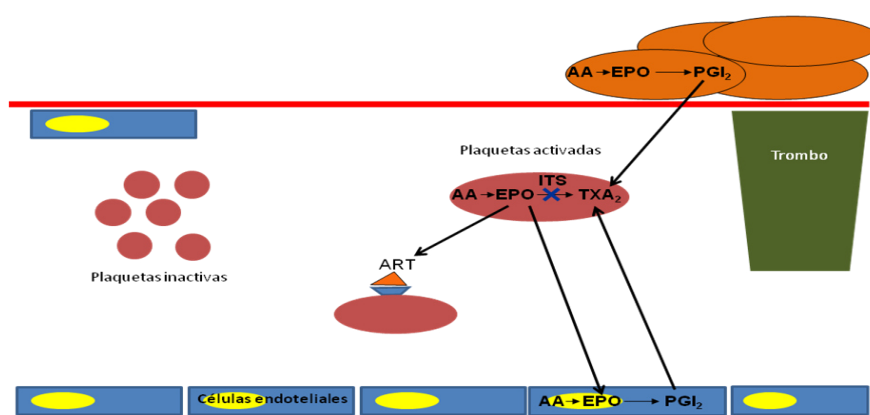


Figura 14: Inhibición combinada de tromboxano-sintetasa y bloqueo del receptor de tromboxano

2.2.6.2. ESTIMULANTES DE NUCLEÓTIDOS CÍCLICOS

Los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc son mediadores intraplaquetarios de moléculas con carácter antiagregante, como prostaciclina y adenosina (actúan a través del AMPc) o el NO (estimula la producción de GMPc). Por lo tanto los fármacos que aumenten la síntesis y/o la semivida de estos nucleótidos frenarán la activación de las plaquetas (De la Cruz JP, 2008).

- Fármacos estimulantes de la adenilciclase

La propia prostaciclina (epoprostenol) o la PGE_1 incrementan la tasa intraplaquetaria de AMPc. El epoprostenol también ejerce un efecto vascular, por lo que produce irremediablemente una intensa vasodilatación no deseable. Para evitar estos efectos, se han desarrollado análogos de la prostaciclina, como **iloprost**; sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado una mayor efectividad sobre la prostaciclina, si bien presentan una mayor estabilidad (De la Cruz JP, 2008).

- Fármacos estimulantes de la guanilciclase

- Los **nitritos** y **nitratos**, administrados con fines vasodilatadores, poseen un efecto antiagregante plaquetario adicional, debido a que estimulan la guanilciclase por mecanismos dependientes del NO, lo cual facilita aún más su acción en el caso de un accidente isquémico coronario, en el que la vasodilatación y la antiagregación plaquetaria son los pilares básicos del proceso terapéutico (De la Cruz JP, 2008).

- Fármacos inhibidores de la PDE

- **Dipiridamol**. Es el fármaco prototipo de este grupo (Fig. 15). Actúa retrasando la degradación de AMPc/GMPc intraplaquetarios.

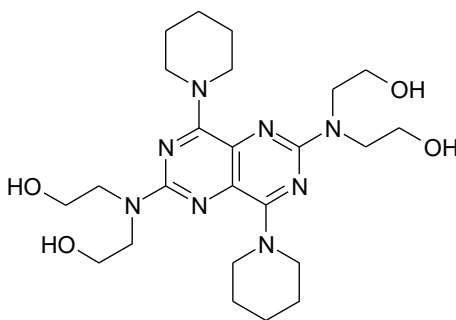


Figura 15: Estructura química de dipiridamol

Su efecto antiplaquetario final podría deberse a la combinación de los siguientes mecanismos: inhibición de la PDE dependiente del GMPc (tipo V) y del AMPc (tipo III), incremento de la tasa extraplaquetaria de adenosina, estímulo de la síntesis de PGI_2 por un mecanismo indirecto basado en la inhibición de la formación de radicales libres y de peróxidos lipídicos vasculares. No obstante, el efecto antiagregante plaquetario del dipiridamol es cuantitativamente débil, y actúa más como modulador de la activación plaquetaria que como un inhibidor. En este sentido se ha postulado la

asociación de dipiridamol con dosis bajas de AAS en un intento de estimular las vías antiplaquetarias endógenas e inhibir la principal vía de activación plaquetaria que es la síntesis de TX (De la Cruz JP, 2008).

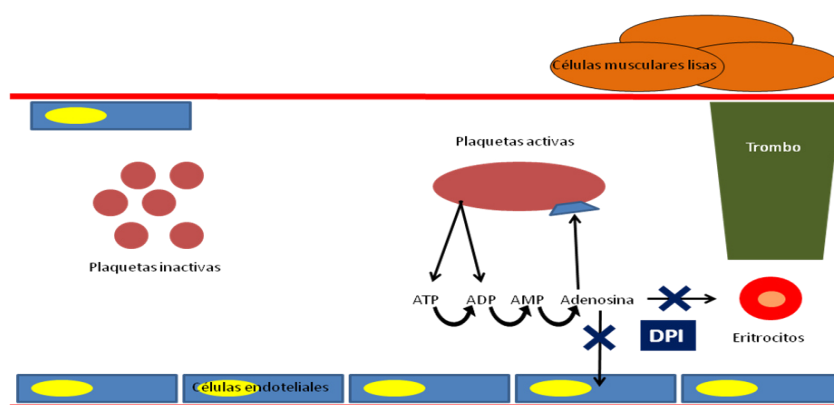


Figura 16: Mecanismo de acción del dipiridamol

El dipiridamol incrementa la concentración local de adenosina. Las células ectonucleotidasas de la superficie de las CE degradan rápidamente en adenosina el ATP y el ADP protrombóticos liberados por la plaquetas activadas. El dipiridamol amplifica este incremento local de adenosina al bloquear su captación por las CE y células sanguíneas. La adenosina se une a las plaquetas a través de receptores de superficie incrementando el AMPc intraplaquetario y previniendo de esta manera la activación y agregación plaquetaria adicional.

Igualmente, el dipiridamol incrementa la relajación del músculo liso vascular y la inhibición propias del NO, antes denominado EDRF o factor relajante derivado del endotelio.

Sus efectos son más evidentes sobre materiales protésicos que sobre superficies biológicas, por lo que se utiliza en pacientes que van a ser sometidos a *by pass* coronario, en los que se observa menor incidencia de reoclusiones.

El dipiridamol se conjuga con ácido glucurónico en el hígado y se elimina por la bilis, sufriendo circulación entero-hepática. Su administración conjunta con AAS inhibe competitivamente la glucuronización, permitiendo niveles más altos, que contrarrestan su mala absorción por vía oral. Los estudios clínicos indican un mayor beneficio en la prevención secundaria de sucesos tromboembólicos cuando se utilizan

conjuntamente AAS y dipiridamol que cuando se administra AAS sólo; sin embargo, la utilidad del dipiridamol en el tratamiento antitrombótico es todavía controvertida (Ling G, 2009).

- **Cilostazol.** Esta molécula (Fig. 17) es un inhibidor oral selectivo de nucleótidos cíclicos de la PDE-III con efecto antiplaquetario, vasodilatador y antimitogénico. Cilostazol inhibe selectivamente la isoenzima PDE-III y la PDE-IIIa (subtipo cardiovascular), a través de un mecanismo AMPc competitivo. La inhibición de la función plaquetaria por cilostazol parece obedecer a la disminución de los niveles de Ca^{2+} intracelular, resultantes del incremento de los niveles de AMPc; además se sugiere que el cilostazol inhibe la agregación plaquetaria suprimiendo la activación de la GPIIb/IIIa. Se utiliza en pacientes con claudicación intermitente en los que aumenta notoriamente la distancia recorrida. (Yoo AR, 2010; Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, 2014). Se han notificado casos de sospechas de reacciones adversas de tipo cardiovascular y hemorrágico asociadas al uso de cilostazol, compatibles con las acciones farmacológicas de cilostazol (AEMPS, 2011).

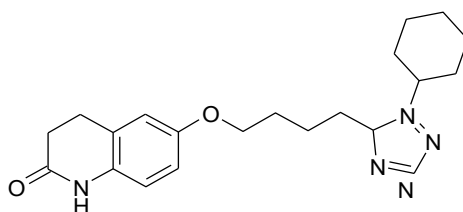


Figura 17: Estructura química de cilostazol

- **Pentoxifilina.** Es un derivado de la metilxantina (Fig. 18) que actúa incrementando los niveles de AMPc, por lo que ejerce su actividad a diferentes niveles; es vasodilatador; incrementa el riego sanguíneo a los tejidos isquémicos; actúa como antiagregante plaquetario por estímulo de la síntesis de PGI_2 ; fibrinolítico, y además reduce la viscosidad de la sangre por incremento de la deformabilidad de los eritrocitos. (Catálogo de Medicamentos, 2016)

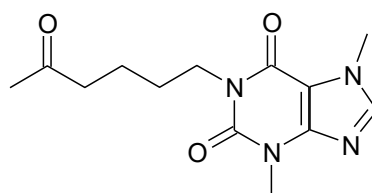


Figura 18: Estructura química de la pentoxifilina

2.2.6.3. ANTAGONISTAS DE ADP

En condiciones fisiológicas, el receptor de membrana plaquetario para el agonista ADP, que es el receptor purinérgico P2Y₁₂, se encuentra estrechamente relacionado con el complejo glucoproteico IIb/IIIa, por lo que los fármacos que bloquean el receptor para ADP modifican indirectamente el funcionalismo del receptor GPIIb/IIIa. El mecanismo de acción de las tienopiridinas, **ticlopidina** y **clopidogrel**, consiste en el bloqueo de la unión del ADP a su receptor P2Y₁₂.

- **Ticlopidina.** Es un derivado del núcleo de tienopiridina (Fig. 19).

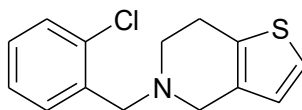


Figura 19: Estructura química de la ticlopidina

Inhibe la fijación del fibrinógeno a las plaquetas activadas, aunque su mecanismo de acción no está completamente dilucidado. Se considera que la principal acción antitrombótica de la ticlopidina es la inhibición irreversible de la agregación plaquetaria inducida por ADP, sin afectar a la vía de la COX (Fig. 20). Las señales transmembrana para la activación y agregación plaquetaria mediada por ADP son alteradas por un metabolito no identificado de ticlopidina.

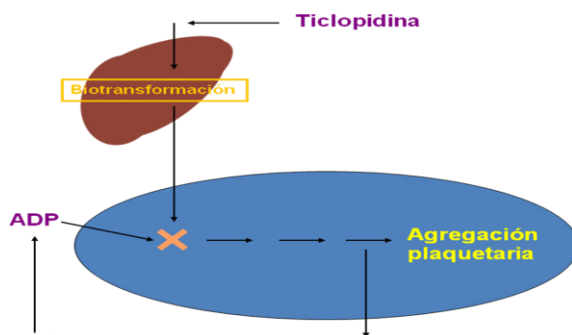


Figura 20: Bloqueo de la vía del ADP de la activación plaquetaria

El efecto de la ticlopidina se ha demostrado en pacientes con angina y en prevención secundaria de infarto de miocardio, infartos cerebrales y otras complicaciones tromboembólicas. También se ha mostrado útil en la prevención de trombosis de fístulas arteriovenosas artificiales, *by pass* aortocoronarios y control de la progresión de la enfermedad arterial periférica (Fettser DV, 2009).

- **Clopidogrel.** Su estructura es casi idéntica a la de ticlopidina, por adición de un carboxilato de metilo (Fig. 21) y también debe ser metabolizado para tener actividad antiagregante. Una ventaja de suma importancia del clopidogrel respecto a la ticlopidina es su inicio de acción mucho más rápido. El objetivo de su diseño fue evitar las discrasias sanguíneas que provocaba la ticlopidina. (De la Cruz JP, 2008).

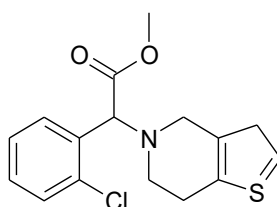


Figura 21: Estructura química de clopidogrel

- **Prasugrel.** Es un nuevo derivado tienopiridínico similar a clopidogrel (Fig. 22). Es también un profármaco que se activa mediante metabolismo hepático. Prasugrel posee ciertas ventajas farmacocinéticas frente a clopidogrel, por ejemplo una mayor potencia y velocidad de acción, lo que permite disminuir la dosis (Schrör K, 2007).

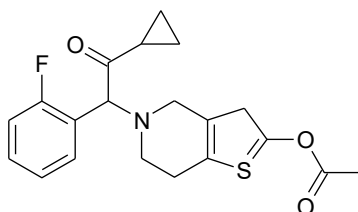


Figura 22: Estructura química de prasugrel

- **Ticagrelor.** Es el más novedoso de este grupo (Fig. 23). Al igual que los derivados tienopiridínicos bloquea el subtipo P2Y₁₂ del receptor de ADP. En contraste con estos antiagregantes, ticagrelor tiene un sitio de unión diferente del ADP ejerciendo un antagonismo alostérico y un bloqueo reversible, sin necesidad de

metabolismo hepático. El estudio RESPOND y el estudio PLATO muestran la eficacia de ticagrelor incluso en pacientes que no respondían al tratamiento con clopidogrel (Gurbel PA, 2010).

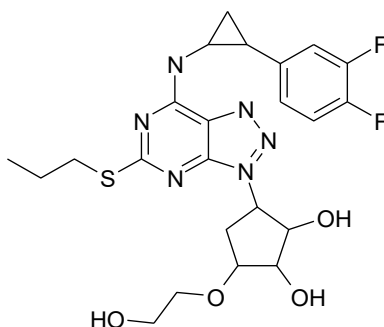


Figura 23: Estructura química de ticagrelor

2.2.6.4. INHIBIDORES DE TROMBINA

Los inhibidores más clásicos de la trombina son las heparinas, que ejercen su función a través de la antitrombina III (AT III). Otra forma de inhibir la trombina es uniéndose directamente a ella por sus lugares activos e impedir que actúe tanto en la coagulación como sobre las plaquetas, ya que la trombina también posee una importancia clave en los procesos de activación y agregación de las plaquetas. Además, la trombina incrementa el ritmo de su propia formación, tanto por la activación de los factores de la coagulación V y VIII, como por la estimulación de las plaquetas para liberar más factor V y para ensamblar los complejos ternarios de coagulación en la superficie vascular.

A partir de arteria umbilical humana se ha aislado una sustancia anticoagulante que inhibe de manera específica el ensamblaje del complejo ternario de la coagulación que da lugar a la formación del trombo. Se trata de una proteína conocida como proteína anticoagulante vascular (VAC). Ésta se une con alta afinidad y de manera Ca^{2+} -dependiente a fosfolípidos cargados negativamente. Su clonación ha puesto de manifiesto que es idéntica a la proteína placentaria 4 (PP4). Es un miembro de la familia de las anexinas (proteínas ligadas a fosfolípidos y a Ca^{2+}) al que se ha denominado **anexina V**, que previene la formación del trombo sin alargamiento del tiempo de hemorragia (Rand JH, 2008).

- **Antagonistas del receptor de trombina**

La capacidad de inhibir la activación de las células vasculares (en especial plaquetas y CMLV) inducida por trombina, sin afectar a las funciones coagulantes de ésta, ofrece una estrategia potencialmente eficaz y segura para la prevención de la trombosis.

La activación de los receptores de trombina se lleva a cabo a través de la acción proteolítica de la trombina sobre el segmento N-terminal de los receptores de proteasa activada (PAR), generando nuevas secuencias aminoacídicas terminales. Éstas autoactivan otras regiones de los receptores PAR e inician la activación plaquetaria vía proteínas G (Dominickj A, 2010). Esta observación ha permitido el desarrollo de un nuevo grupo de fármacos antiagregantes plaquetarios, los antagonistas del receptor plaquetario de la trombina, PAR-1.

- **Dabigatrán.** El dabigatrán etexilato es un profármaco inactivo, que tras su absorción se metaboliza a través de esterasas plasmáticas y hepáticas a su forma activa, dabigatrán. Éste es un inhibidor directo, competitivo y reversible de la trombina, enzima que cataliza la transformación del fibrinógeno en fibrina. La inhibición de la cascada de coagulación evita la formación de trombos. Además, el dabigatrán parece inhibir la agregación plaquetaria. Se han descrito análogos peptídicos que suprimen la activación plaquetaria inducida por trombina, pero sin inhibir su actividad enzimática; sin embargo estos compuestos tienen una actividad agonista débil y pueden afectar de manera no selectiva la función de las CE (Arpijuntarangkoon J, 2007).

2.2.6.5. INHIBIDORES DE LA ADHESIÓN DE LAS PLAQUETAS AL FvW

La superficie de las plaquetas posee receptores glucoproteicos que median su adhesión inicial al fvW subendotelial (Fig. 24). Se trata de las proteínas Ib, que no son integrinas. Los anticuerpos monoclonales (AcMo) dirigidos contra el fvW o la GPIb suprimen la adhesión plaquetaria e inhiben la formación del trombo, como ocurre en la enfermedad de von Willebrand, caracterizada por la ausencia de dicho factor funcionalmente activo, o en el síndrome de Bernard-Soulier, que cursa con deficiencia de GPIb.

Otros objetivos potenciales de los inhibidores de la adhesión plaquetaria son la GPIV, así como los receptores de la familia integrina para el colágeno (Ic/Ila), fibronectina (Ic/Ila) y vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) (Toth J, 2009).

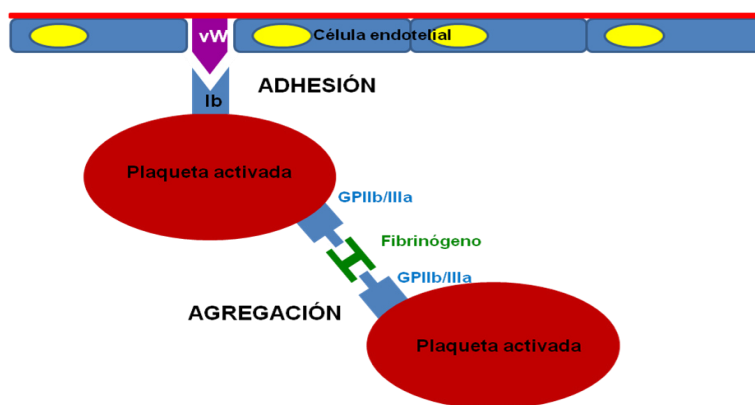


Figura 24: Mecanismos de adhesión y agregación plaquetaria

2.2.6.6. PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas PGI_2 , PGD_2 y PGE_1 son poderosos inhibidores de la agregación plaquetaria, así como eficaces vasodilatadores. Se unen a receptores específicos de la superficie de las plaquetas y activan a la adenilil-ciclasa plaquetaria unida a la membrana (Fig. 25). La resultante elevación de la concentración de AMPc suprime los mecanismos dependientes del Ca^{2+} de la activación plaquetaria, no sólo la agregación, sino también la reacción de liberación inducida por la agregación, y tal vez incluso la adhesión plaquetaria. En base a este mecanismo podría esperarse que el tratamiento con PG inhibiese más eficazmente las plaquetas que la inhibición del TX (por medio de AAS) o del ADP (con ticlopidina). Sin embargo el tratamiento en humanos está limitado por varios problemas, como la hidrólisis rápida de PGI_2 (vida media inferior a tres minutos), la desensibilización precoz de los receptores, la menor densidad de receptores en pacientes con cardiopatía isquémica, así como el problema de vasodilatación con descenso tensional y aumento de la frecuencia cardíaca con dosis relativamente pequeñas (Iyú D, 2011).

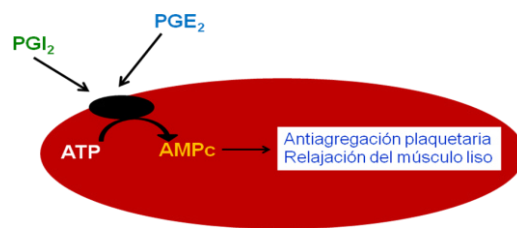


Figura 25: Mecanismo de acción de las prostaglandinas PGI₂ y PGE₂

2.2.6.7. ANTAGONISTAS DEL COMPLEJO RECEPTORIAL GPIIb/IIIa

El complejo receptorial GPIIb/IIIa es el miembro más prevalente de la familia de las integrinas. Son receptores de la superficie plaquetaria que, además de poseer un importante papel en la agregación plaquetaria, participan en el proceso de adhesión.

La interacción del fibrinógeno con las plaquetas es necesaria para que tenga lugar el proceso de la agregación plaquetaria. Este hecho se ha comprobado al estudiar el comportamiento de las plaquetas deficitarias de receptor para el fibrinógeno, como las de pacientes con tromboastenia de Glanzmann. Dichas plaquetas cambian de forma y liberan normalmente el contenido de sus gránulos, pero no forman agregados. Estos hechos llevaron a la conclusión de que la unión del fibrinógeno a su receptor, la GP IIb/IIIa, es el punto común en la activación las plaquetas por cualquier agonista.

El fibrinógeno es una GP dimérica formada por tres pares de cadenas, α , β y γ , unidas covalentemente mediante puentes disulfuro. La molécula se organiza en diferentes dominios estructurales, como el dominio central (dominio E), que contiene las regiones amino terminal de las seis cadenas polipeptídicas, mientras que las regiones carboxilo terminal se localizan en dos dominios D diferentes. Cada molécula de fibrinógeno posee tres sitios para la unión con el receptor GPIIb/IIIa. Uno lo constituye la secuencia RGD (Arg-Gly-Asp) en las posiciones 572-574 de las mismas cadenas, y el último es una región de doce aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de las cadenas γ , específicamente localizada en las posiciones 400-411 con una secuencia final aminoacídica KQAGDV (Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val). Esta última secuencia denominada H12, es exclusiva del fibrinógeno y parece ser la responsable de su actividad agregante específica, tal y como han revelado los estudios con microscopía electrónica utilizando el receptor GPIIb/IIIa aislado (Hantgan RR, 2006), (Hantgan RR, 2010). En dichos

estudios se pone de manifiesto que el 85% del receptor se une específicamente a esta secuencia, aunque no es necesaria en el proceso de retracción del coágulo de fibrina.

Otros ligandos de GPIIb/IIIa comparten la secuencia RGD, como fvW, fibronectina y vitronectina y pueden sustituir al fibrinógeno en casos de afibrinogenia. No se descarta que en otros dominios del fibrinógeno puedan desempeñar un papel importante en la interacción con las plaquetas, asumiendo que la secuencia dodecapeptídica de la cadena α no es suficiente para mediar la agregación irreversible.

Las plaquetas en reposo poseen la capacidad de unirse al fibrinógeno inmovilizado, aún siendo tratadas con un inhibidor de la agregación plaquetaria (PGE_2). Esto pone de manifiesto que existe al menos un dominio capaz de soportar la interacción de las plaquetas antes de ser activadas. Sin embargo, estas mismas plaquetas no son capaces de fijar el fibrinógeno soluble, que es el que iniciaría el proceso de la agregación, sino que únicamente son capaces de unir una pequeña cantidad de fibrinógeno que estaría relacionada con el transporte constitutivo y la incorporación del mismo a los gránulos α . Por lo tanto, es necesaria la activación del receptor, ya que de este modo se produce un incremento de la afinidad por sus ligandos, debido al cambio conformacional que sufre GPIIb/IIIa al ser activado por distintos agonistas como ADP, trombina, etc.

El mecanismo de activación del GPIIb/IIIa permanece sin dilucidar completamente, pero se sabe que los dominios citoplasmáticos de este receptor están implicados en el proceso. Las subunidades α y β poseen unas secuencias de aminoácidos próximas a la membrana plasmática, con una configuración similar cuya delección conduce a la activación del receptor. Estos datos sugieren que las secuencias forman una estructura de bisagra próxima a la membrana, que mantienen la integrina en estado de baja afinidad por los ligandos. Las secuencias de la región carboxilo terminal de ambas subunidades también parecen implicadas en la activación del receptor, ya que la delección de las mismas inhibe la adhesión de las plaquetas. La presencia de residuos de Tyr, Thr y Ser conservados en su totalidad, indica que su fosforilación podría regular esta activación, aunque el mecanismo de señalización intracelular no está perfectamente esclarecido (Wang WY, 2007).

Existen evidencias de que tras la activación de las plaquetas por los agonistas, el paso a la conformación de elevada afinidad se lleva a cabo mediante receptores acoplados a proteínas G (RAPG). Estos hechos se determinaron estudiando la ausencia de agregación plaquetaria en ratones *knock-out Gqα*, en respuesta a ADP y trombina. La $Gq\alpha$ activa la $PLC\beta$ que provoca la hidrólisis de fosfatidilinositoles y la liberación de inositol trifosfato (IP_3) y diacilglicerol (DAG) que activan la PKC y liberan Ca^{2+} , y de este modo activarían al receptor GPIIb/IIIa. Otra isoforma de PLC, la $PLC\gamma_2$, también es fosforilada tras la activación plaquetaria con colágeno. Estas experiencias han permitido sugerir que existen otras tirosin-cinasas o fosfatasas implicadas al menos, en respuesta a otros agonistas. También se ha descrito la posible implicación de fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) en este proceso, ya que los antagonistas de este enzima inhiben parcialmente la unión de fibrinógeno a GPIIb/IIIa. La transducción de señales hacia el exterior de la plaqueta es todavía más compleja (Canobbio I, 2009).

Se han propuesto dos hipótesis para explicar el mecanismo de activación de GPIIb/IIIa (Fig. 26). Una de ellas es la denominada “modulación de la afinidad del receptor”, que propone la existencia de interacciones directas entre proteínas reguladoras y la integrina, las cuales estimulan el cambio conformacional del receptor para exponer los sitios de unión al fibrinógeno y al fvW. Estas proteínas reguladoras podrían ser proteínas transmembrana que interaccionarían con alguna porción de la integrina, o factores intracelulares que lo harían con las colas citoplasmáticas del receptor. Algunas de las proteínas reguladoras propuestas son calreticulina, talina, α -actinina, pp^{125FAK} , CIB (proteína selectiva para el dominio α_{IIb}) y β_3 -endoxina (selectiva para el dominio β_3). Según esta hipótesis, la interacción de los factores citoplasmáticos con la cola de la integrina, rompería la bisagra próxima a la membrana plasmática y produciría la propagación del cambio conformacional a través de la capa lipídica, al dominio extracelular, modificando así su afinidad por el ligando.

Existe una segunda hipótesis. Se trata de un modelo para el cambio conformacional que experimenta el receptor GPIIb/IIIa, en el que la región amino terminal de la subunidad α forma sobre la β una estructura de hélice con el sitio de unión a ligando en la superficie.

También se ha sugerido la posibilidad de que exista un segundo sitio de unión en la subunidad β , que en el estado de baja afinidad se situaría por encima de la hélice de α_{IIb} , bloqueando el acceso a los sitios de esta subunidad. Tras la activación, el cambio conformacional liberaría el dominio β_3 de su contacto con α_{IIb} (Banno A, 2008).

Los inhibidores de la GPIIb/IIIa plaquetaria reducen la incidencia de angina y reinfarto en pacientes con angina inestable y/o infarto de miocardio sin onda Q y previenen la reoclusión coronaria en pacientes sometidos a intervenciones percutáneas coronarias.

La angioplastia transluminal percutánea es una técnica mínimamente invasiva que está teniendo un gran éxito, ya que permite recuperar la luz de los vasos estenosados a muchos pacientes que sufren cardiopatía isquémica. El éxito de este tipo de intervencionismo cardiaco se debe al desarrollo de potentes antiagregantes plaquetarios que bloquean los receptores GPIIb/IIIa (Zaragozá F, 2006)

Los nuevos fármacos deberán producir una inhibición prolongada de la GPIIb/IIIa, evitando fluctuaciones en los niveles plasmáticos que favorecen la aparición de efectos protrombóticos. Esto se consigue diseñando fármacos que presenten una alta afinidad por el receptor, una lenta velocidad de disociación del mismo y una semivida prolongada (Tamargo J, 2005).

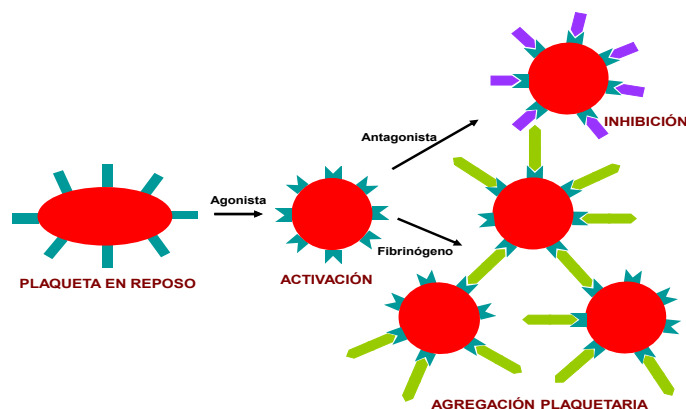


Figura 26: Proceso de activación y agregación plaquetaria e inhibición de la agregación plaquetaria por antagonistas de los receptores GPIIb/IIIa

Existen diversos estudios que demuestran la utilidad de abciximab en la reducción de eventos isquémicos tras angioplastia y la reducción de la incidencia de infarto de

miocardio. También se ha estudiado su efectividad en angina inestable y los resultados en este sentido están siendo alentadores (Ferenczi EA, 2008).

Por otra parte, existen pocos datos acerca de la administración simultánea de agentes trombolíticos e inhibidores del receptor GPIIb/IIIa.

- Productos naturales

- **Trigramin.** Es un potente inhibidor de la unión al receptor GPIIb/IIIa aislado a partir del veneno de la víbora *Trimeresurus gramineus*. Se han obtenido péptidos de similares características a partir de otras especies de víboras. Estos péptidos se conocen como desintegrinas. Sin embargo tienen el inconveniente de poseer capacidad antigénica, por lo que se han empleado principalmente para diseñar antagonistas sintéticos de bajo peso molecular (Calvete JJ, 2005).

- Anticuerpos monoclonales

- **Abciximab.** Es un AcMo que se acopla a los receptores GPIIb/IIIa bloqueándolos. Es un antiagregante muy potente que sólo puede administrarse por infusión intravenosa. La incidencia de episodios hemorrágicos es alta. La indicación autorizada es la prevención de la obstrucción vascular tras angioplastia, en tratamiento aditivo al AAS y a heparina (Catálogo de Medicamentos, 2016).

- Péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos lineales basados en esta secuencia Arg-Gly-Asp (secuencia RGD) común del fibrinógeno y de algunos venenos tienen una escasa actividad y una pobre estabilidad en el plasma, mientras que los péptidos cíclicos son más resistentes a la ruptura enzimática y tienen, teóricamente, una mayor potencia (Reiss S, 2006).

- **Eptifibatida.** Es un péptido cíclico basado en una secuencia Lys-Gly-Asp (KGD) en forma de hélice, en lugar de una secuencia RGD del fibrinógeno, y parece ser un inhibidor más específico de la GPIIb/IIIa. Contiene 6 aminoácidos con grupos amido cisteína y mercaptopropionilo, que se unen al receptor plaquetario GPIIb/IIIa (Fig. 27). De esta forma, inhibe reversiblemente la agregación plaquetaria al impedir la unión del fibrinógeno, del fvW y de otros ligandos de adherencia, a los receptores GPIIb/IIIa. Eptifibatida está indicada en prevención de infarto de miocardio en pacientes con angina inestable o infarto de miocardio sin onda Q en los que el

último episodio de dolor torácico haya ocurrido dentro de las 24 horas y con cambios en ECG y/o con las enzimas cardíacas elevadas (Catálogo de Medicamentos, 2016).



Figura 27: Sitios de unión al receptor GPIIb/IIIa (Sitges M, 2000)

Otro enfoque adoptado en el diseño de estos fármacos ha sido mimetizar la secuencia RGD mediante la síntesis de pequeñas moléculas de derivados peptídicos y no peptídicos, con el fin de superar los problemas de inestabilidad y tiempo de vida corto de los péptidos sintéticos.

- Inhibidores no peptídicos

Los inhibidores no peptídicos de la proteína IIb/IIIa no tienen los α -aminoácidos del grupo peptídico (no están unidos a péptidos), lo que evita el bajo tiempo de supervivencia en la circulación; sin embargo, su disociación del receptor GPIIb/IIIa es mucho más rápida que la de eptifibatida. De hecho, su acción revierte pronto, mientras que la acción de abciximab se prolonga considerablemente más en el tiempo. En este grupo se incluyen **lamifibán** y **tirofibán**. Tirofibán es un derivado no peptídico de la tirosina que ha demostrado su utilidad en el tratamiento de la reestenosis postangioplastia y de angina inestable (Van't Hof AW, 2009).

- Inhibidores orales

Los inhibidores orales del receptor GPIIb/IIIa se han diseñado también como profármacos que se metabolizan a la forma activa tras la ingestión, o bien como agentes activos por vía oral de un modo inherente. Estos preparados han mostrado potencia similar pero la biodisponibilidad de los profármacos suele ser mayor. Uno de

estos compuestos es el **xemilofibán**. En general, estos productos no han dado buen resultado. (Brugts JJ, 2009).

2.3. ENDOTELIO Y PATOLOGÍA ENDOTELIAL

2.3.1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Actualmente, la principal causa de muerte en España, en ambos sexos, son las enfermedades del aparato circulatorio (Anuario del Instituto Nacional de Estadística, 2012), aunque la mortalidad ha ido disminuyendo de forma considerable. Según datos del Centro Nacional de Epidemiología las dos primeras causas de mortalidad en ambos sexos en 2011 fueron la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular. En países como Estados Unidos los datos epidemiológicos son similares, aunque las tasas de mortalidad por enfermedad cardiovascular están en descenso, esta afección sigue siendo la causa principal de muerte de este país (Sherry L, 2010).

En la mayoría de los casos, las patologías cardiovasculares no tienen una etiología única identificable, aunque estudios prospectivos, como el de Framingham y otros similares han identificado los factores de riesgo que predisponen a la aparición de este tipo de cuadros (O'Donella CJ, 2008).

Algunos de estos factores de riesgo, independientes entre sí, como la hipertensión arterial (HTA), el tabaquismo, la diabetes, la edad avanzada, la obesidad, la hipercolesterolemia o niveles de colesterol-HDL bajos, se relacionan significativamente con un mayor riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares.

El endotelio vascular desempeña un papel crítico en la regulación de la hemostasia. Los factores de riesgo descritos anteriormente afectan al normal funcionamiento del mismo desencadenando la activación celular, inflamación local, formación de trombos, etc., lo cual conlleva al desarrollo de eventos cardiovasculares.

El estudio de la fisiología del endotelio y la disfunción endotelial han conducido a importantes avances en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad cardiovascular, al tiempo que han proporcionado numerosas vías de actuación en el abordaje terapéutico de la misma (Reriani MK, 2012).

2.3.2. ENDOTELIO VASCULAR

La pared vascular aparece dividida en tres capas que se denominan, desde la luz hacia el exterior, íntima, media y adventicia. En cada una de ellas predomina un tipo celular con una función determinada; en la íntima predominan CE; en la media aparecen células musculares lisas (CML) y tejido conectivo; mientras que en la adventicia se encuentran fibras elásticas. El grosor de las capas varía según se trate de arterias, venas, capilares o arteriolas (Junqueira LC, 2005).

La capa íntima o endotelio se encuentra relacionada directamente con la luz vascular actuando como receptor y transmisor de señales. Las CE son capaces de registrar cambios hemodinámicos de la sangre como la presión o las fuerzas de rozamiento y cizallamiento, cambios en sus interacciones con las plaquetas y los leucocitos, o modificaciones de los mensajeros químicos circulantes, respondiendo mediante la liberación de factores vasoactivos. Según esto, el concepto clásico de endotelio vascular como una barrera que separa la sangre de la pared vascular ha quedado atrás para dejar paso a una nueva concepción del endotelio, considerado un órgano de regulación vascular con acciones exógenas, paracrina y autocrina, implicado en numerosos procesos vasoactivos, metabólicos e inmunitarios, mediante la liberación de numerosos factores (Tresguerres JF, 2010).

El mayor vasodilatador liberado por el endotelio es el NO. Otros vasodilatadores derivados del endotelio incluyen PGI₂ y bradicinina. Prostaciclina actúa sinérgicamente con el NO inhibiendo la agregación plaquetaria. Bradicinina estimula la liberación de NO, PGI₂ y factor hiperpolarizante del endotelio (EDHF), otro vasodilatador que contribuye a la inhibición de la agregación plaquetaria. Bradicinina también estimula la producción del activador de plasminógeno tisular (t-PA), el cual juega un importante papel en la fibrinólisis (Triggle CR, 2012).

No se debe descartar la actividad proagregante, protrombótica y antifibrinolítica mediada por el fvW, la fibronectina, el factor V y el PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno). En condiciones normales predominan las acciones antiagregantes, mientras que en situaciones patológicas existe un desequilibrio, con un aumento del riesgo de padecer enfermedades trombóticas.

El tono vasomotor se mantiene gracias al equilibrio existente entre las acciones relajantes del músculo liso vascular de NO, PGI₂ y EDHF, y las acciones constrictoras de la endotelina 1 (ET-1) y el TXA₂ (Cohen JD, 2007).

El endotelio participa también en la respuesta inflamatoria mediante la producción de mediadores como la interleuquina 8 (IL-8), el PAF o la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP); y mediante la expresión de moléculas de adhesión como la E-selectina, la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1) y la molécula de adhesión endotelial plaquetaria (PECAM-1).

Estas moléculas son expresadas en respuesta a diversos factores de crecimiento y citoquinas, como la IL-1 y TNF α ; y median la interacción de los leucocitos con la pared vascular y la migración de éstos al espacio extravascular (Haverslag R, 2008).

Por último, el endotelio regula el crecimiento de las células de la pared vascular mediante la liberación de factores de crecimiento.

2.3.3. PATOLOGÍA DEL ENDOTELIO VASCULAR

La disfunción endotelial se define como una serie de alteraciones que afectan a una o varias de las funciones que ejerce el endotelio. Aparece por tanto una pérdida de la función de barrera selectiva, tendencia a la agregación plaquetaria y a la formación de trombos, tendencia a la adhesión de leucocitos, vasoconstricción y proliferación de las CML y fibroblastos. Dada la importancia del NO en la hemostasia vascular, se considera que la disfunción endotelial se caracteriza principalmente por una reducida disponibilidad de este factor. El aumento de estrés oxidativo, y en concreto de los niveles de anión superóxido, es una causa frecuente de disfunción del endotelio debido al aumento de la inactivación del NO por estos aniones. Además de la reducida disponibilidad del NO, el aumento de ET-1, TXA₂ y otros factores contribuyen también al desarrollo de esta patología.

2.3.3.1. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis (AT) se caracteriza por lesiones de la íntima, llamadas ateromas, o placas ateromatosas, que sobresalen en la luz vascular y la obstruyen. La aterosclerosis

causa una mortalidad y morbilidad en el mundo occidental más elevada que cualquier otra enfermedad.

La enorme importancia de la AT ha estimulado los esfuerzos para descubrir su causa. Desde el punto de vista histórico han predominado dos hipótesis sobre la aterogénesis. Una de ellas resaltaba la proliferación celular en la íntima, mientras que la otra concedía importancia primordial a la organización y el crecimiento repetitivo de trombos. El concepto actual sobre la patogenia de la aterosclerosis incorpora elementos de ambas teorías antiguas teniendo en cuenta factores de riesgo como la hipertensión, el tabaquismo o la diabetes. Dicho concepto considera que la AT es una respuesta inflamatoria crónica de la pared arterial iniciada por la lesión del endotelio. Además, la progresión de la lesión se mantiene por la interacción entre lipoproteínas modificadas, macrófagos procedentes de los monocitos, linfocitos T y los constituyentes celulares normales de la pared arterial (Riccioni G, 2012).

La primera fase de la AT se caracteriza por un engrosamiento de la íntima con un aumento en la proliferación de las CML y matriz extracelular (Hansson GK, 2006). A continuación tiene lugar una acumulación de depósitos lipídicos que constituyen la base para la formación de la placa de ateroma. Los macrófagos fagocitan productos de degradación de las LDL transformándose en células espumosas, las cuales secretan mediadores pro-inflamatorios que inducen la expresión de las moléculas de adhesión celular VCAM-1 e ICAM-1 en la superficie de las CE activadas, así como las selectinas E y P. Esto conduce al reclutamiento de células T y macrófagos en la pared arterial.

Las CML en la íntima producen los componentes de la matriz extracelular que incluyen colágeno, elastina y proteoglicanos, constituyendo la capa fibrosa que da estabilidad a la placa de ateroma. Las CML sintetizan también citoquinas proinflamatorias incluyendo IL-1 y TNF α . Éstas y otras citoquinas, como el interferón γ (INF γ) potencian la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, CML y macrófagos. Además contribuyen al reclutamiento de macrófagos y células T en la placa, a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), a la estimulación de metaloproteinasas de la matriz (MMP) y a la inducción de la expresión del factor tisular (Kumar V *et al.*, 2010)

La lesión endotelial inducida en animales de experimentación mediante denudación mecánica, fuerzas hemodinámicas, depósito de complejos inmunes, irradiación o sustancias químicas, causa engrosamiento de la íntima y, en presencia de una dieta rica en lípidos, conduce a la formación de ateromas típicos. Sin embargo, las lesiones humanas precoces comienzan en sitios con un endotelio morfológicamente intacto, por lo que la anomalía iniciadora puede ser la disfunción endotelial sin denudación, que aumenta la permeabilidad endotelial, favorece la adherencia de los leucocitos y altera la expresión de productos de los genes de las CE (Kumar V *et al.*, 2010).

Aunque se desconoce la causa específica de la disfunción endotelial en la AT precoz, se consideran factores desencadenantes los derivados del humo del tabaco, la homocisteína y, posiblemente, virus y otros agentes infecciosos. Las citoquinas inflamatorias, como el TNF, estimulan la expresión de genes endoteliales que pueden favorecer la aterosclerosis. Sin embargo, se cree que los dos determinantes más importantes de las alteraciones endoteliales, quizá actuando simultáneamente, son las alteraciones hemodinámicas y los efectos adversos de la hipercolesterolemia (Kumar V *et al.*, 2010).

Las zonas con flujo turbulento, alterado y fuerza de arrastre baja, están predisuestas a la AT, mientras que aquellas con flujo laminar uniforme parecen estar protegidas. El flujo laminar normal, hallado típicamente en áreas protegidas contra las lesiones de la vasculatura arterial, bloquea los mecanismos inflamatorios que median la disfunción del endotelio y la apoptosis de las CE. El flujo laminar induce también la expresión de genes endoteliales, cuyos productos, como el antioxidante superóxido dismutasa (SOD), protegen contra el desarrollo de lesiones (Gimbrone MA, 2013).

Entre los agentes farmacológicos más empleados para el abordaje terapéutico de la aterosclerosis se encuentran las estatinas, inhibidores competitivos de la hidroximetilglutaril-coenzima A reductasa. Este tipo de fármacos ejerce un efecto pleiotrópico disminuyendo los niveles de LDL y de mediadores inflamatorios en la pared vascular (Alexios S, 2012).

La terapia inmunológica para la aterosclerosis está aún en fase de experimentación. Algunos estudios plantean el posible beneficio del empleo de anticuerpos frente a

TNF α o el receptor para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Delgado L *et al.*, 2012).

El uso de AAS y otros agentes antiplaquetarios que inhiben la vía de la COX, se correlaciona con una disminución de los marcadores inflamatorios en sangre. (Muhlestein JB, 2010)

2.3.3.2. INSUFICIENCIA VENOSA CRÓNICA

Las enfermedades venosas de miembros inferiores se deben a la existencia de algún elemento que dificulta el retorno de la sangre al corazón. El retorno de la sangre de los miembros inferiores se realiza a través de dos sistemas venosos: un sistema venoso superficial (SVS), constituido por las venas safena interna y externa que aporta el 10% de la sangre y un sistema venoso profundo (SVP) que sigue el mismo trayecto que las arterias pero en sentido inverso, que drena el 90% de la sangre de los miembros inferiores.

Ambos sistemas están comunicados por el sistema de las venas perforantes, a lo largo de toda la extremidad, que permite el paso de sangre desde la superficie a la profundidad. Estos sistemas permiten la circulación de la sangre en la dirección correcta gracias a un sistema gobernado por válvulas unidireccionales (Fig. 28) (Pérez JL, 2004).

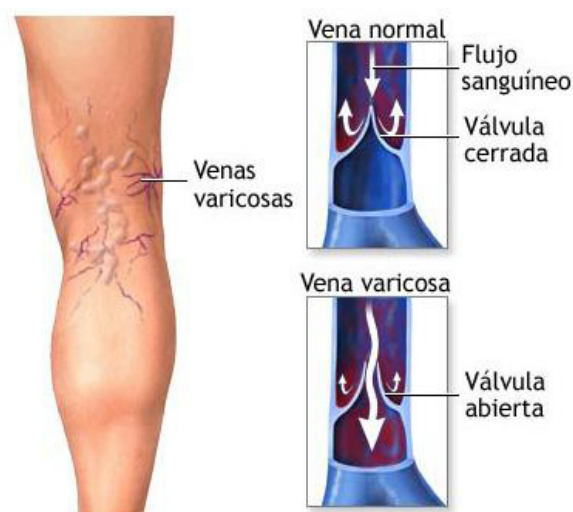


Figura 28: Flujo sanguíneo en una vena normal y en una vena varicosa (Valencia C, 2011)

En reposo absoluto, las válvulas venosas carecen de función, pero durante el esfuerzo abdominal y el trabajo muscular se pone en juego el papel de estas válvulas para permitir que la sangre no se remanse en los territorios más distales. Si por cualquier motivo se produce un fallo en la función de estas válvulas, tiene lugar un importante trastorno de la corriente sanguínea, que cambia de orientación en el SVP, y se incrementa el aporte a las venas superficiales, que debido a ello aumentan de diámetro y longitud y se tornan varicosas. Así pues, la insuficiencia venosa crónica es un cuadro clínico ocasionado por la dificultad del retorno venoso de las extremidades inferiores. La OMS define el término variz, varices o venas varicosas como dilataciones permanentes de las venas, que con frecuencia son tortuosas (Guyton AC, 2011).

La insuficiencia venosa está presente entre un 10 y un 50% de la población adulta del mundo desarrollado. En España, se estima que un 40-50% de la población adulta padece un síndrome varicoso en diverso grado, y de éstos, un tercio de los pacientes sufrirán una insuficiencia venosa clínicamente significativa. El coste global de su atención sanitaria viene a suponer entre el 2 y el 5% del presupuesto sanitario y son responsables de la ocupación del 5-10% de las camas de los hospitales públicos. Las complicaciones ulcerosas y tróficas pueden afectar, en nuestro país, a más de 300.000 adultos, con la correspondiente repercusión laboral y de calidad de vida de estos pacientes. La presencia de varices en las mujeres, en especial de entre 20 y 40 años, es entre 2 y 5 veces superior a la del hombre. El problema estético no debe minimizarse (Cuéllar S, 2005; Escudero JR, 2013).

- **Clasificación y etiopatogenia**

Las varices primarias o esenciales son aquellas de origen desconocido. En este tipo, el historial familiar de varices es determinante en el 97% de los pacientes que las presentan. Asimismo, son factores de riesgo el estreñimiento crónico, los embarazos múltiples, ya que la progesterona dilata las venas, y las profesiones que requieren muchas horas de trabajo de pie y con poca movilidad. Las varices esenciales tienen una menor tendencia a la ulceración.

Las varices secundarias son fundamentalmente secuelas de una trombosis, denominadas postflebíticas, con tendencia a la ulceración, o postraumáticas o por fístulas arteriovenosas. En estas últimas también hay antecedentes familiares, y pueden aparecer en la infancia, presentando tendencia a la varicorrágia (pérdida sanguínea por rotura) y a la ulceración de curso tórpido. El mecanismo de producción de las varices se debe fundamentalmente a un aumento de la presión venosa o una debilidad de la pared. Esto origina, en ambos casos, una dilatación que desemboca en una insuficiencia valvular. Ésta, por consiguiente, puede preceder a las varices y ser su causa (Guyton AC, 2011).

En el caso de las varices esenciales, la insuficiencia valvular se localiza preferentemente en el SVS y en el perforante, mientras que en las posttrombóticas se afectan, en la mayoría de los casos, venas superficiales, perforantes y profundas. La actividad de la musculatura de los miembros inferiores se considera de gran importancia, ya que, en condiciones normales, facilita el bombeo de sangre venosa hacia el corazón, gracias a que la válvula venosa impide el retroceso de este flujo. En presencia de una válvula insuficiente, la prensa muscular es incapaz de solventar el remanso (estasis) sanguíneo producido en las extremidades inferiores.

En todas las insuficiencias venosas crónicas se produce una hipertensión retrógrada intermitente, debido al fallo valvular, que alcanza a los segmentos más distales, vénulas y capilares, por lo que afecta a los tejidos. Este fenómeno circulatorio se manifiesta en forma de alteración de la permeabilidad, eccema, anoxia progresiva tisular que lleva a la necrosis, lo que se traduce, en los casos más avanzados, en la ulceración típica de origen venoso (Estevan JM, 2005).

- **Sintomatología**

La sintomatología es muy variable y generalmente no guarda relación con la dimensión de las varices, sino con el grado de insuficiencia venosa crónica. Por este motivo, hay pacientes, generalmente varones, que presentan varices importantes con varias décadas de evolución y que rechazan el tratamiento por no sufrir molestia alguna; mientras que otros con pequeñas varices sufren molestias importantes. En general, las

manifestaciones más frecuentes son dolor, edema, calambres nocturnos y prurito. El dolor suele ser poco intenso y no siempre está presente. Incluso, en ocasiones, la causa del dolor ni siquiera son las varices. Un caso especial son las varices posteriores del muslo, que pueden doler por compresión, cuando el paciente está en posición sentada (Cuéllar S, 2005).

El edema es, en general, consecuencia de la insuficiencia venosa profunda y en ocasiones puede deberse a una insuficiencia importante de las safenas. La pesadez de piernas suele acompañar al edema, y ambos son de predominio vespertino y mejoran con el reposo. Los calambres nocturnos no son exclusivos de la insuficiencia venosa, ya que aparecen también en otras patologías.

El prurito es un síntoma de cuadros varicosos evolucionados en los que se presentan trastornos cutáneos. Pueden sobreañadirse lesiones de rascado del tipo dermatitis eccematosa. La sintomatología clínica de la insuficiencia venosa suele mostrarse de forma evolutiva existiendo, en líneas generales, diversos estadios:

- En el *grado I* se observa un aumento del relieve y de la visibilidad de la red venosa en la superficie cutánea.
- En el *grado II* aparecen síntomas subjetivos como cansancio, pesadez y lentitud de las piernas, dolor, calambres y edema. Esta sintomatología aparece al principio de forma esporádica y relacionada con permanencias prolongadas de pie, calor o ciclo menstrual (*grado IIa*), pero posteriormente la sintomatología descrita se hace persistente, constante y crónica (*grado IIb*).
- En el *grado III* aparecen signos de sufrimiento cutáneo, como picor, quemazón, aumento de la pigmentación (dermatitis ocre), capilaritis, induración y atrofia.
- El *grado IV* viene definido por la úlcera varicosa o flebostática, consecuencia de formas necróticas de capilaritis. Esta ulceración no es una complicación propiamente dicha, sino la evolución a largo plazo del síndrome varicoso, sobre el que pueden aparecer otras complicaciones (Pérez JL, 2004).

Las varices aumentan el riesgo de trombosis superficial por la existencia de una estasis venosa; como consecuencia, se produce una tromboflebitis que cursa con dolor, se observa un cordón duro y una zona eritematosa, todo ello localizado en el trayecto de

la vena o venas trombosadas. Las lesiones tróficas de la piel pueden ser de distinta gravedad, desde eccema, hiperpigmentación o atrofia cutánea hasta úlceras que pueden ser de gran tamaño y se localizan, habitualmente, por encima del maléolo interno de la pierna. Debido a la atrofia cutánea, se produce una disminución del grosor de la piel que cubre la variz, lo que, unido a la fragilidad de la pared venosa, puede producir varicorragias. Éstas pueden ser consecuencia de pequeños traumatismos, o incluso espontáneas, y pueden llegar a ser muy copiosas. Asimismo, las úlceras pueden también sangrar (Estevan JM, 2005).

- **Tratamiento**

El tratamiento es fundamentalmente sintomático y está encaminado a prevenir la evolución de las varices, sus complicaciones y secuelas. Una vez instauradas las varices, no existe tratamiento medicamentoso que pueda revertir el proceso. La eliminación de la variz sólo puede realizarse quirúrgicamente (Estevan JM, 2005).

Todos los factores que favorezcan la estasis sanguínea venosa de las piernas empeoran las varices. Por ello, se debe aconsejar al paciente algunas pautas para facilitar el retorno venoso y potenciar la bomba muscular.

El paciente debe evitar el sedentarismo, períodos prolongados de pie o sentado, cambiando cada cierto tiempo de actividad o dando un pequeño paseo. Igualmente, deben evitarse los viajes prolongados o, en su caso, mover las piernas y flexionar los pies, evitar el calor en las piernas, baños solares prolongados, saunas y baños muy calientes, ya que producen vasodilatación y disminuyen el retorno venoso de los miembros inferiores. Por el contrario, son recomendables las duchas frías sobre las piernas, con movimientos circulares ascendentes desde los pies.

Las medidas dietéticas van encaminadas a disminuir el consumo de sal, ya que retiene líquidos y favorece el edema, y a evitar el sobrepeso o la obesidad.

Durante el embarazo, todas estas medidas deben extremarse, ya que la compresión del feto sobre el territorio venoso de retorno y los cambios hormonales, junto con un aumento del volumen circulante, pueden complicar las varices existentes o favorecer la aparición de nuevas.

La elastocompresión del miembro inferior es muy importante, pero se deben evitar prendas elásticas que compriman la circulación de retorno. Son aconsejables medias elásticas de compresión decreciente desde el pie hasta el muslo. Asimismo, los vendajes elásticos, que permiten aplicar la presión adecuada a la extremidad, también son de utilidad, pero menos prácticos (Rocha E, 2010).

El tratamiento farmacológico de la insuficiencia venosa periférica va encaminado a conseguir diversos objetivos. Por una parte, aumentar el retorno venoso, incrementando el tono, la competencia valvular y la bomba muscular. Asimismo, se pretende disminuir los trasudados y aumentar la reabsorción de los mismos desde el intersticio. Como veremos, con los medicamentos actuales a nuestro alcance, la terapia farmacológica se limita al alivio de algunos de los síntomas varicosos, sin llegar en ningún caso a una resolución total del problema (Cuéllar S, 2005).

La pentoxifilina ha mostrado utilidad en la prevención de úlceras venosas de las extremidades inferiores (Jull A, 2007).

a) Venotónicos (flebotónicos). Favorecen el retorno venoso gracias a su acción vasoconstrictora sobre las fibras musculares de las paredes arteriolas y venosas.

b) Vasoprotectores. Aumentan la resistencia vascular y disminuyen la permeabilidad capilar. Entre éstos se encuentran los bioflavonoides troxerutina, diosmina y hesperidina, que, además de venotónicos, son considerados como factores de protección capilar. Igualmente, se considera como protectores capilares a los antocianósidos del *Vaccinium myrtillus*, conocido comúnmente como arándano, que además de su efecto vasoprotector, tiene propiedades diuréticas y astringentes (Tamargo J, 2003).

c) Incrementadores de la reabsorción del trasudado. En este grupo se encuentran los diuréticos, que disminuyen el edema.

d) Heparinoides. Actúan como activadores de la fibrinólisis, por lo que reducen los trombos y los depósitos de fibrina. Por otra parte, tienen propiedades antiinflamatorias al inhibir la hialuronidasa. Su empleo en varices es de utilidad en caso de flebitis.

- FARMACOS ANTIVARICOSOS

- **Glucosaminagluconato, polisulfato** (HIRUDOID FORTE[®], MOVILAT[®])
- **Ácido pentosanopolisulfúrico** (THROMBOCID[®])

Son análogos de la heparina, de estructura polisacárida, con acción anticoagulante por activación de la fibrinólisis, al incrementar la actividad de la antitrombina III. Por ello, reducen los trombos y los depósitos de fibrina. Por otra parte, tienen propiedades antiinflamatorias, al ser inhibidores de la hialuronidasa. Están indicados en procesos varicosos, tromboflebitis superficial, hematoma, tumefacciones. Se administran por vía tópica (Catálogo de Medicamentos, 2016).

- ESCLEROSANTES

- **Polidocanol** (ETOXISCLEROL[®])

Es un agente esclerosante tensioactivo no iónico con propiedades surfactantes, indicado en esclerosis de varices, varículas superficiales en estrella, varices primitivas sin insuficiencia de la safena, esclerosamiento de hemorroides, telangiectasia y displasia venosa tipo *klippel-trenaunay* (Catálogo de Medicamentos, 2016).

- PROTECTORES DE CAPILARES

- **Dobesilato cálcico** (DOXIUM[®])

Es un agente vasoprotector. Actúa sobre las paredes del capilar regulando sus funciones fisiológicas deterioradas, como el aumento de la permeabilidad y disminución de la resistencia. Incrementa la flexibilidad eritrocitaria, inhibe la hiperagregabilidad plaquetaria y, en retinopatía diabética, reduce la hiperviscosidad plasmática y sanguínea, mejorando las propiedades reológicas y la irrigación tisular.

- **Diosmina** (DAFLÓN[®])
- **Hidrosmína** (VENOSMIL[®])
- **Troxerutina** (ESBERIVEN[®])
- **Ruscogeninas** (RUSCUS[®])
- **Oxerutina** (VENORUTON[®], VENORUGEL[®])
- **Ruscogeninas** (RUSCUS[®])

-
- **Centella asiática** (GRAIL®)
 - **Escina** (FLEBOSTATIN®)
 - ***Vitis vinífera*** (ANTISTAX®)

Muchos de estos productos poseen actividad sobre el sistema vascular como factores vitamínicos P (mejoran la permeabilidad y aumentan la resistencia de los capilares sanguíneos) (Carretero ME, 2000; Álamo C, 2001).

El tratamiento quirúrgico está indicado en cuadros varicosos sintomáticos que no mejoran con tratamiento conservador y también puede plantearse en pacientes con varices asintomáticas que, por su tamaño o localización, pueden ser causa de complicaciones en el futuro. Una de las técnicas más utilizadas es la fleboextracción de la safena correspondiente al territorio de las varices. En ocasiones se realiza la ligadura de los cayados de las venas safenas y de algunas de las perforantes (Badri H, 2008)

La técnica CHIVA (Cura Hemodinámica de la Insuficiencia Venosa Ambulatoria) es conservadora, se realiza bajo anestesia local y se basa en realizar ligaduras esclerosadas por debajo de cada vena perforante. En casos de varices pequeñas o en recidivas poco importantes se puede emplear la esclerosis farmacológica (polidocanol, glicerina cromada, esclereno, tromboxano, glucosa, etc.) (PARÉS JO, 2010).

Recientemente se han empezado a tratar con láser las pequeñas varices, bajo anestesia tópica o con enfriamiento de la piel. El láser produce una coagulación de estas pequeñas arañas vasculares de menos de un milímetro de diámetro. De momento, su empleo parece tener una indicación estética y carecemos de información contrastada de su eficacia. Como efectos adversos se han descrito enrojecimiento y pigmentación (Theivacumar NS, 2011)

2.4. LA INFLAMACIÓN

Aunque ya aparecían en un papiro egipcio (3000 a.C.), fue Celso el primero que describió los cuatro signos cardinales de la inflamación: rubor, tumor, calor y dolor. A mediados del siglo XIX, Virchow añadió la impotencia funcional, y en 1793, Hunter señaló que la inflamación no es una enfermedad sino una respuesta saludable de los

tejidos. Más tarde, Cohnheim (1839-1884) estudió la respuesta inflamatoria al microscopio y describió el incremento de la permeabilidad vascular y el fenómeno de diapedesis leucocitaria.

La fagocitosis fue descrita por Metchnikoff en 1882 y la existencia de mediadores químicos en la respuesta inflamatoria fue señalada a principios del siglo XX por Sir Thomas Lewis (Rodríguez FJ, 2003).

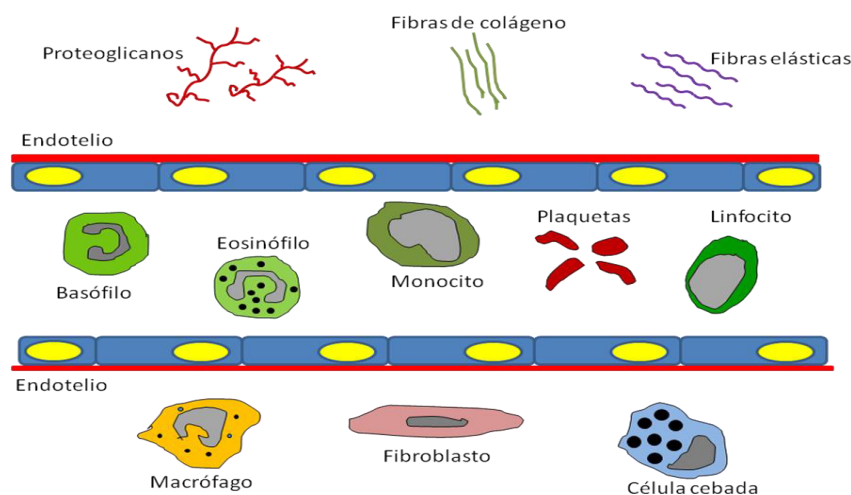


Figura 29: Representación esquemática de las células intravasculares, componentes de la matriz de tejido conjuntivo y células del tejido conjuntivo, implicados en la respuesta inflamatoria

Todos los agentes etiológicos, cuando producen una lesión en los diferentes tejidos del organismo, originan una reacción característica del tejido conjuntivo vascular, estereotipada desde el punto de vista morfológico, y mediada por agentes químicos que, clínicamente, origina manifestaciones locales y en mayor o menor grado sistémicas. A esta respuesta similar ante causas muy diversas, marchamo de la respuesta tisular a la agresión, se la denomina inflamación.

La respuesta inflamatoria está muy relacionada con el proceso de la reparación. La inflamación es útil para destruir, diluir y localizar al agente agresor y al mismo tiempo, origina una serie secuencial de acontecimientos que intentan curar y reconstruir la zona lesionada. En este sentido, la inflamación es fundamentalmente una respuesta de carácter protector cuyo objetivo es librar al organismo del agente agresor. No obstante, la inflamación puede ser perjudicial por la intensidad de su respuesta (Guyton AC, 2011).

Para que se produzca una respuesta inflamatoria es necesaria la existencia de un agente agresor capaz de producir una lesión subletal y que exista viabilidad tisular para reaccionar y reparar el daño ocasionado. Sin embargo, separar los efectos directos del agente agresor y los resultantes de la reacción tisular es difícil y, muchas veces, la intensidad de la respuesta tisular es más perniciosa que la alteración originada por el agente agresor.

La inflamación no es un proceso único, sino una serie de cambios hemodinámicos complejos que se producen en la zona lesionada (Fig. 29). La respuesta inflamatoria tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica a los constituyentes celulares y extracelulares del mismo, incluyendo al plasma, las células circundantes y los vasos sanguíneos. Las células circulantes son los neutrófilos polimorfonucleares (PMNN), los monocitos, los eosinófilos, los linfocitos, los basófilos y las plaquetas. Las células de tejido conjuntivo son las células cebadas, los fibroblastos, los macrófagos y los linfocitos residentes. La matriz extracelular está constituida por proteínas fibrilares estructurales (colágeno y elastina), glucoproteínas adhesivas (fibronectina, laminina, colágeno no fibrilar, entactina, tenascina) y otras (Guyton AC, 2011).

La inflamación aguda es la respuesta inmediata que se produce frente a un agente agresor o lesivo. Predominan en ella los fenómenos vasculares y exudativos. Por otra parte, la inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza histológicamente por la presencia de linfocitos y macrófagos y por la proliferación de vasos sanguíneos. Nos centraremos en la inflamación aguda.

En la **inflamación aguda**, inmediatamente después de la agresión se puede producir una arterioloconstricción transitoria, que no siempre se presenta y es poco importante. El paso siguiente es una dilatación arteriolar y venular, con apertura de canales preferenciales del lecho microvascular, lo que origina un aumento del flujo sanguíneo de varias veces por encima de lo normal. Inicialmente este aumento del flujo es muy rápido, con acentuación del flujo axial arteriolar y venular, que lleva al acúmulo central de los hematíes y leucocitos. Estos cambios duran de minutos a horas. A continuación el flujo empieza a enlentecerse y las células sanguíneas se desplazan hacia la periferia, llegando a cesar por completo en algunos vasos, adquiriendo el

aspecto de una columna inmóvil y distendida por el acúmulo de células. Esta estasis sanguínea puede persistir y terminar con la muerte y desintegración vascular; pero en muchos casos se reinicia el flujo sanguíneo hasta hacerse normal.

Al mismo tiempo o antes de producirse el enlentecimiento del flujo sanguíneo y mientras la estasis se manifiesta, los leucocitos se acumulan en la zona periférica del vaso, especialmente en las vénulas adhiriéndose al endotelio para dar origen al fenómeno que Cohnheim denominó **pavimentación** (Rodríguez FJ, 2003).

Muchas de estas células adheridas pueden atravesar la pared venular hacia el espacio extravascular, lo que se conoce como **migración leucocitaria**, que originará su acumulación en el foco lesional. Su duración es variable y dependerá del agente agresor y de la intensidad de la lesión.

2.4.1. ALTERACIONES VASCULARES

Las principales alteraciones vasculares que se producen en el proceso inflamatorio son:

- Alteraciones en el calibre y flujo vascular, que se inician de forma muy rápida tras la lesión y cuya evolución depende de la intensidad de ésta.
- Constricción arteriolar, que puede originarse por una respuesta directa de la musculatura arteriolar ante el agente agresor.
- Vasodilatación, que depende de factores nerviosos y humorales. Diferentes sustancias como la bradicinina, PGE₁ y PGE₂ intervienen en el proceso de la vasodilatación. Este hecho origina un aumento en el flujo sanguíneo, que a su vez será el responsable del enrojecimiento y aumento de calor en la zona.

La lentitud o retraso de la circulación se debe al aumento de la permeabilidad vascular en la microcirculación, lo que origina una salida de líquido rico en proteínas (exudado) desde la circulación hacia los espacios intersticiales. La disminución del líquido intravascular provoca un aumento de la viscosidad sanguínea, lo que se refleja durante la fase de estasis. Según va evolucionando la estasis los leucocitos emigran hacia la periferia (pavimentación) adhiriéndose al endotelio, de forma transitoria al principio y con mayor intensidad después, atravesando la pared vascular al cabo de un

corto período de tiempo y dirigiéndose hacia el intersticio en el proceso que describimos a continuación (Rodríguez FJ, 2003).

2.4.2. AUMENTO DE LA PERMEABILIDAD VASCULAR

El aumento de la permeabilidad vascular que da lugar a la salida del exudado hacia el intersticio es la característica principal y de mayor especificidad de la inflamación aguda. Este exudado puede tener diferente apariencia según los elementos que predominen en él, agua (seroso), fibrina (fibrinoso), leucocitos (purulento), hematíes (hemorrágico), membranas celulares (membranoso).

La pérdida de líquido rico en proteínas plasmáticas reduce la presión oncótica intravascular e incrementa la presión oncótica intersticial. Esto, junto con el aumento de la presión hidrostática vascular, secundaria a la vasodilatación, da lugar a una mayor salida de líquido hacia el intersticio. Es lo que constituye el edema o tumor en el foco inflamatorio (Langer HF, 2009).

La normalidad del intercambio de líquidos y de la permeabilidad vascular dependen de la integridad del endotelio, pero en la inflamación el endotelio se encuentra alterado por varios mecanismos:

- 1.- Contracción de las células endoteliales con ensanchamiento de las uniones intercelulares y formación de aperturas intercelulares. Suele ser el mecanismo más común, y es producido por histamina, bradicinina, leucotrienos y otros mediadores químicos.
- 2.- Reorganización del citoesqueleto y de los mecanismos de unión intercelular (retracción endotelial). A partir de estudios *in vitro* se sabe que intervienen en este proceso algunos mediadores como IL-1, TNF e IFN- γ .
- 3.- Lesión endotelial directa con necrosis y despegamiento de las célula endoteliales.
- 4.- Lesión endotelial mediada por leucocitos. Los leucocitos pueden activar la liberación de formas tóxicas de oxígeno y de enzimas proteolíticas que pueden lesionar al endotelio.
- 5.- Filtración a través de los capilares en regeneración (Rao RM, 2007).

2.4.3. ACONTECIMIENTOS CELULARES

2.4.3.1. EXTRAVASACIÓN Y FUNCIÓN FAGOCÍTICA DE LOS LEUCOCITOS

Una de las funciones más características e importantes de la inflamación es el aporte de leucocitos a la zona de lesión. Los leucocitos fagocitan los agentes agresores, destruyen las bacterias y otros microorganismos y degradan los tejidos necróticos y los antígenos extraños. También producen enzimas, radicales tóxicos de oxígeno y mediadores químicos que pueden prolongar la inflamación. La secuencia de acontecimientos que se producen desde que los leucocitos salen de la luz vascular hasta que alcanzan el tejido intersticial aparece representada esquemáticamente en la figura 30 (Langer HF, 2009).

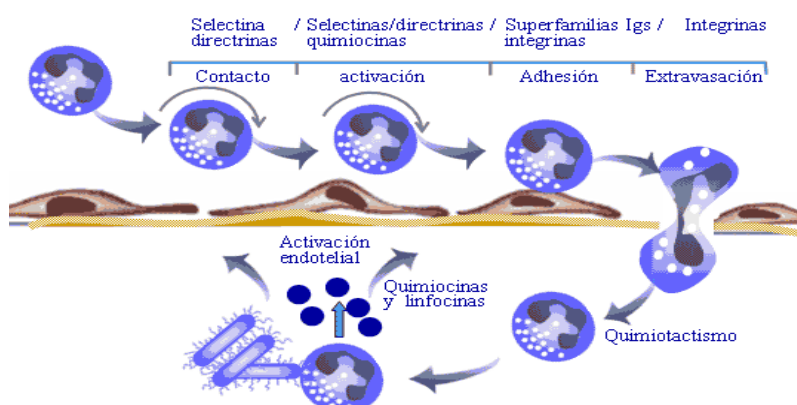


Figura 30: Secuencia de acontecimientos leucocitarios en la inflamación (Peña JJ, 2012)

Cuando el flujo de sangre es normal, los hematíes y leucocitos forman una columna axial y sólo muy pocas células entran en contacto con el endotelio. Cuando va disminuyendo la velocidad del flujo, por el aumento de la permeabilidad vascular y de la viscosidad sanguínea, los leucocitos emigran hacia la periferia, a lo largo de la pared endotelial. A este proceso se le denomina **marginación** y se debe principalmente a las alteraciones en las condiciones hemodinámicas producidas por el retraso en la circulación de la sangre. Más tarde los leucocitos se colocan sobre el endotelio y se adhieren transitoriamente al mismo. Este proceso se denomina **rodamiento**. Al final se produce su adhesión al endotelio, proceso denominado **pavimentación**. A continuación emiten pseudópodos hacia las uniones entre las CE quedando entre la CE y la membrana basal, para finalmente atravesar la membrana basal y pasar al espacio

intersticial. Este mecanismo lo utilizan todos los tipos de leucocitos, los linfocitos y los monocitos (Chavakis E, 2009).

2.4.3.2. ADHESIÓN Y TRANSMIGRACIÓN

Hoy día sabemos que la adhesión y la trans migración de leucocitos vienen determinadas por la fijación de moléculas complementarias de adhesión a la superficie de los leucocitos y CE y que ciertos mediadores químicos (factores quimiotácticos y ciertas citoquinas) intervienen en el proceso modulando la expresión de superficie y la intensidad de las moléculas de adhesión. Los receptores de adhesión implicados pertenecen a tres familias de moléculas, las selectinas, las inmunoglobulinas y las integrinas.

Para modular la adhesión en la inflamación existen varios mecanismos que dependen de la duración de la inflamación, del tipo de estímulo inflamatorio y de las condiciones del flujo sanguíneo (Wittchen ES, 2009)

- Redistribución de las moléculas de adhesión hacia la superficie celular (Fig. 31). La P-selectina, por ejemplo, existe normalmente en la membrana de los gránulos intracitoplasmáticos endoteliales específicos denominados cuerpos de Weibel-Palade. Al ser activados por mediadores como la histamina, trombina, y factor activador de plaquetas (FAP), la P-selectina se redistribuye hacia la superficie celular donde puede fijar leucocitos (Zhang J, 2011).

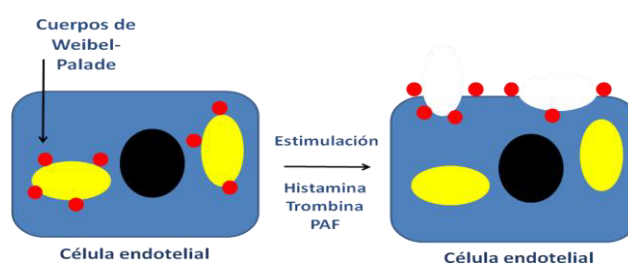


Figura 31: Mecanismo de redistribución de la P-selectina para explicar la adhesión de los leucocitos al endotelio

- Inducción de las moléculas de adhesión sobre el endotelio (Fig. 32). Algunos mediadores de la inflamación como la IL-1 y TNF, inducen la síntesis y expresión en la superficie de moléculas de adhesión endotelial, por ejemplo la E-selectina (Zhang J, 2011).

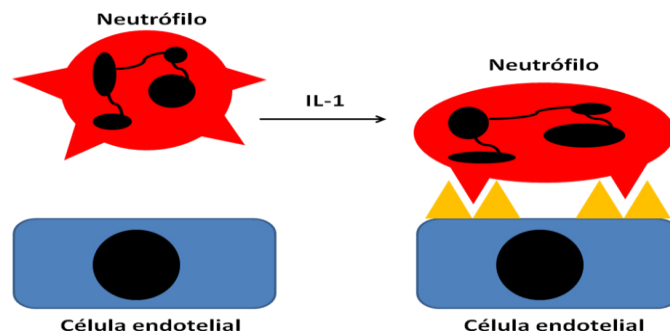


Figura 32: Mecanismo de activación del endotelio por citoquinas para la adhesión de los leucocitos al endotelio

- Aumento en la intensidad de la fijación (Fig. 33). Este es el mecanismo más importante para la fijación de integrinas. Cuando los PMNN son activados por agentes quimiotácticos u otros estímulos, la integrina LFA-1 pasa de un estado de baja a un estado de alta afinidad de fijación para la inmunoglobulina ICAM-1 debido a que su molécula sufre una modificación de tipo configuracional. En situaciones de flujo sanguíneo lento, estasis, la interacción LFA-1/ICAM-1 da lugar a su adhesión firme al endotelio y también parece ser un requisito necesario para la trans migración (Zhang J, 2011).

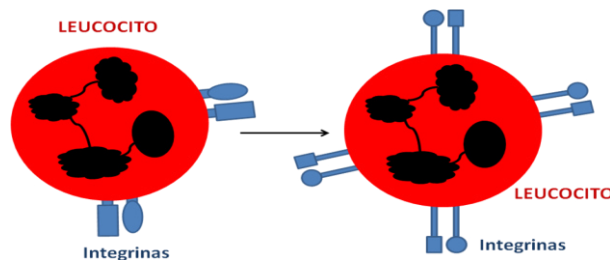


Figura 33: Mecanismo de aumento en la intensidad de las integrinas para la adhesión de los leucocitos al endotelio

La secuencia de acontecimientos para la adhesión y trans migración de los neutrófilos en la inflamación aguda, que aparece representada en la figura 34, sería la siguiente:

- 1) Adhesión inicial rápida y relativamente laxa que se corresponde al rodamiento y en la que están implicadas las selectinas P y L.
- 2) Posteriormente, los leucocitos activados más tarde por agentes elaborados por el endotelio y otras células, aumentan la intensidad de fijación de la integrinas.

3) Los leucocitos se unen de forma estable al endotelio a través del mecanismo de la integrina ICAM-1 (Chavakis E, 2009).

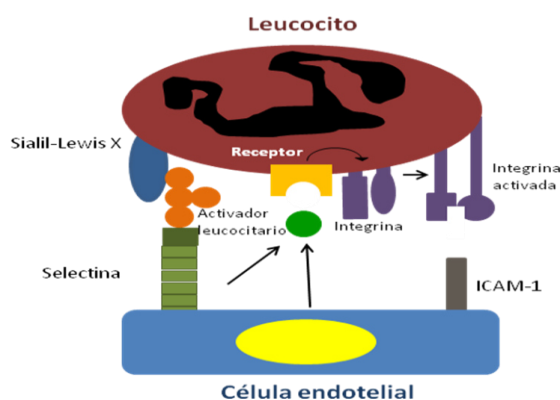


Figura 34: Representación de las fases del reconocimiento del endotelio por parte de los PMNN

2.4.3.3. QUIMIOTAXIS Y ACTIVACIÓN LEUCOCITARIA

Una vez producida la extravasación, los leucocitos emigran hasta alcanzar la zona lesionada. Este fenómeno se denomina quimiotaxis y está regulado químicamente.

Los factores quimiotácticos pueden ser exógenos o endógenos. Los agentes exógenos más comunes son los productos bacterianos. Los mediadores endógenos son los componentes del sistema del complemento; los productos de la vía de la LOX y las citoquinas.

No se conoce con exactitud cómo tiene lugar este proceso, pero sí se han esclarecido algunos mecanismos. Los agentes quimiotácticos se unen a receptores específicos de las membranas de los leucocitos activando una fosfolipasa C, proceso mediado por proteínas G. Ésta a su vez, produce la hidrólisis del PIP_2 en IP_3 y DAG, así como la liberación de Ca^{2+} , siendo este último el que desencadena la activación de los elementos celulares responsables del movimiento celular. El leucocito se mueve extendiendo un pseudópodo que tira del resto de la célula. En el interior del pseudópodo existe una proteína contráctil, la miosina, así como elementos fibrilares de actina (Zarbock A, 2011).

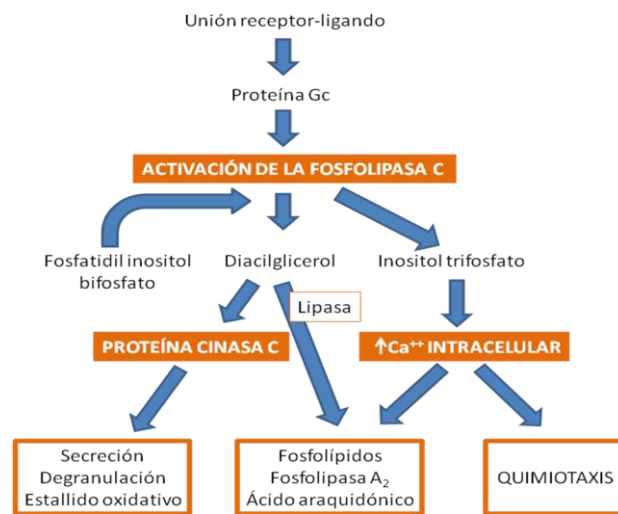


Figura 35: Representación gráfica de los mecanismos bioquímicos en la activación leucocitaria

Además del estímulo locomotor, muchos agentes quimiotácticos inducen otras respuestas leucocitarias con la denominación común de activación leucocitaria (Fig. 35). Dentro de éstas se encuentran:

- Producción de metabolitos del AA.
- Desgranulación y secreción de enzimas lisosomales y activación del mecanismo oxidativo.
- Modulación de las moléculas de adhesión leucocitaria.

Más tarde se describió el denominado cebamiento leucocitario, que consiste en el aumento de la velocidad e intensidad de la activación leucocitaria por la exposición de esta célula a un mediador que, por sí mismo tiene una acción activadora escasa.

En todos estos fenómenos de activación leucocitaria intervienen los diferentes factores quimiotácticos descritos anteriormente (Chavakis E, 2009).

2.4.3.4. FAGOCITOSIS

Una vez producida la lesión por el agente agresor, se produce la fagocitosis, un mecanismo para hacer desaparecer el agente agresor y los tejidos destruidos. Los mecanismos de degradación consisten en la destrucción a través de intermediarios reactivos de oxígeno, intermediarios reactivos de nitrógeno o a través de antimicrobianos preformados (Steevels TA, 2011).

2.4.3.5. LIBERACIÓN DE PRODUCTOS LEUCOCITARIOS

Las alteraciones que sufren las membranas de los PMNN y los macrófagos durante la quimiotaxis y la fagocitosis dan lugar a la liberación de productos, no sólo hacia el interior del fagolisosoma sino también, en ocasiones, hacia el espacio extracelular. Las más importantes son *enzimas lisosomales*, presentes en los gránulos de los PMNN; *metabolitos activos de oxígeno* y *productos derivados del metabolismo del AA*, como las PG y los LT. Estos productos son potentes mediadores de la lesión endotelial y tisular; y amplifican los efectos del estímulo inflamatorio inicial, por lo que en algunos casos se convierten en agentes lesivos constituyendo un mecanismo básico de muchas enfermedades humanas (Steevels TA, 2011).

2.4.4. MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN

Las alteraciones vasculares y celulares descritas son producidas por diferentes mediadores inflamatorios que se liberan como consecuencia del reconocimiento del agente patógeno. Éstos incluyen lípidos, como las PG, los LT y el PAF, que son producidos rápidamente por los macrófagos a través de rutas enzimáticas que degradan los fosfolípidos de la membrana (Fig. 36). Sus acciones son seguidas por las de citoquinas y quimioquinas, que son sintetizadas y secretadas por los macrófagos en respuesta a agentes patógenos.

Si se ha producido una herida, la lesión de los vasos sanguíneos desencadena inmediatamente dos cascadas enzimáticas protectoras. El **sistema de quininas** es una cascada enzimática de proteínas plasmáticas que se activa por la lesión tisular y produce diversos mediadores inflamatorios, incluido el péptido vasoactivo bradicinina. Esto causa un aumento en la permeabilidad vascular que promueve el flujo de proteínas plasmáticas al sitio de la lesión tisular. El **sistema de la coagulación** es otra cascada enzimática de proteínas plasmáticas que se desencadena como consecuencia de la lesión en los vasos sanguíneos. Ello lleva a la formación de un coágulo que impide que los microorganismos penetren en el torrente sanguíneo (Langer HF, 2009).

Describiremos a continuación los mediadores químicos más importantes del proceso inflamatorio.

1. Aminas vasoactivas. Se hallan almacenadas en gránulos intracelulares. Tienen efecto vasodilatador potente y aumentan la vasopermeabilidad en los procesos inflamatorios. Entre ellas se encuentran la histamina, la serotonina y la sustancia P.

2. Proteasas plasmáticas. Sistema del complemento, sistema de las quininas, sistema de la coagulación.

3. Metabolitos del AA. El AA es un ácido graso poliinsaturado que procede de la dieta o de la conversión a partir del ácido linoleico. Su metabolismo se lleva a cabo por dos vías principales la de la COX y la de la LOX (Fig. 36).

- *Vía de la COX.* Esta vía permite la formación de PG y de TX. Las prostaglandinas PGE_2 , PGD_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ y PGI_2 , tienen una acción vasodilatadora e inhibidora de la agregación plaquetaria interviniendo en la producción del edema. Los TX tienen una acción vasoconstrictora y de agregación plaquetaria.

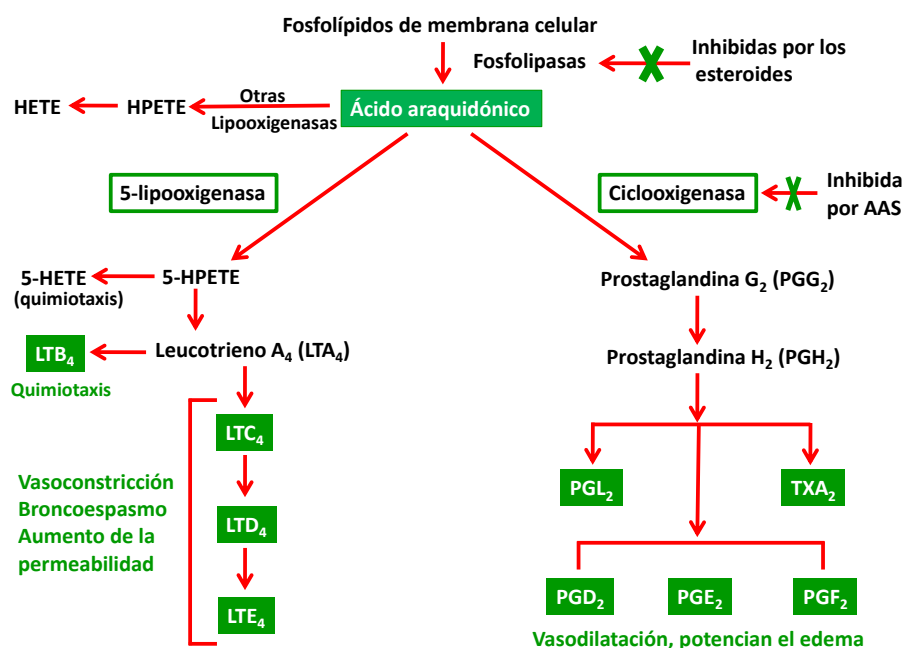


Figura 36: Rutas de biosíntesis de derivados del ácido araquidónico y función que desempeñan en la inflamación

- *Vía de la LOX.* Por esta vía se produce el 5-HETE con capacidad quimiotáctica para neutrófilos que se convierte en la familia de los LT. El LTB_4 es un potente agente quimiotáctico que también es capaz de inducir la agregación de neutrófilos. LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 producen vasoconstricción y aumento de la permeabilidad vascular.

Los derivados del AA pueden actuar como mediadores en todos los pasos de la inflamación aguda.

4. Factor activador de plaquetas (PAF). Se sintetiza en plaquetas, neutrófilos, macrófagos y CE. Promueve, entre otras, la activación y la agregación plaquetaria, aumenta la permeabilidad vascular, estimula la liberación de TNF- α y la síntesis de eicosanoides (Esplugues JV, 2008).

5. Citoquinas. Están implicadas en las respuestas inmunitarias pero también desempeñan una función importante en la respuesta inflamatoria. Las principales citoquinas que actúan como mediadores de la inflamación son la IL-1, el TNF y la familia de las IL-8 (Esteller A, 2007).

6. Óxido nítrico (NO). Participa en la regulación del tono vascular y media la citotoxicidad del macrófago en la defensa inmunitaria específica. Cuando la óxido nítrico sintasa es inducida por la presencia de determinadas citoquinas, genera durante períodos prolongados un volumen importante de NO que actúa como citotóxico (Esplugues JV, 2008).

7. Enzimas lisosomales y radicales libres. Destruyen las células fagocitadas, pero también lesionan al tejido cuando se vierten en el foco inflamatorio. Las proteínas del estrés (proteínas del choque térmico), cuya síntesis se incrementa cuando hay lesión tisular, tienen funciones reparadoras y podrían actuar como moduladores de la acción oxidante lesiva (Esteller A, 2007).

9. Moléculas de adhesión. En las membranas de los leucocitos se han identificado diferentes moléculas o antígenos con funciones muy variadas. Con respecto a la inflamación nos interesan las moléculas de adhesión intercelular o adhesinas, que median la unión física entre las células o entre éstas y elementos del tejido conjuntivo (Cuéllar S, 2005).

2.4.4.1. CITOQUINAS

Las citoquinas son mediadores solubles de la respuesta inmunológica, de la inflamación, del crecimiento celular y del desarrollo embrionario. Son proteínas de bajo peso molecular producidas por diferentes tipos de células, macrófagos y linfocitos T

activados, que actúan a través de su unión a receptores específicos expresados en células diana. La expresión de estos receptores está modulada en parte por sus propias citoquinas. Algunas citoquinas promueven claramente la inflamación por lo que son denominadas citoquinas proinflamatorias, mientras que otras suprimen la actividad de las citoquinas proinflamatorias, y son llamadas citoquinas antiinflamatorias. Las citoquinas ejercen sus acciones a través de tres mecanismos: sobre la misma célula (autocrino), sobre células inmediatas (paracrino) o lejos de la célula productora (endocrino). Una citoquina simple puede actuar en diferentes tipos de células y un sólo tipo de células puede ser diana de citoquinas muy diversas (Moreno R, 2002). Sus acciones se resumen en la figura 37.

Las citoquinas poseen nombres históricamente relacionados con sus células secretoras o con sus principales funciones. Así, los mediadores solubles sintetizados por leucocitos, monocitos y linfocitos, fueron designados como interleuquinas, monoquinas y linfoquinas, respectivamente; sin embargo, tales términos no son correctos en todos los casos, ya que se sabe que algunas interleuquinas son sintetizadas y actúan sobre otras células que no son leucocitos. Por este motivo algunas citoquinas producidas sólo por leucocitos no son llamadas interleuquinas. Actualmente existen 18 citoquinas con el nombre de interleuquina. Otras, como el TNF- α , han conservado su nombre según la descripción biológica original. En recuerdo a la función de las citoquinas, algunos términos son también restringidos como en el caso de los factores estimulantes de colonias o los factores de crecimiento, los cuales ejecutan acciones adicionales a la diferenciación y proliferación celular, como el TGF- β , que ejerce una potente actividad inhibitoria en reacciones inflamatorias e inmunes (Tayal V, 2008).

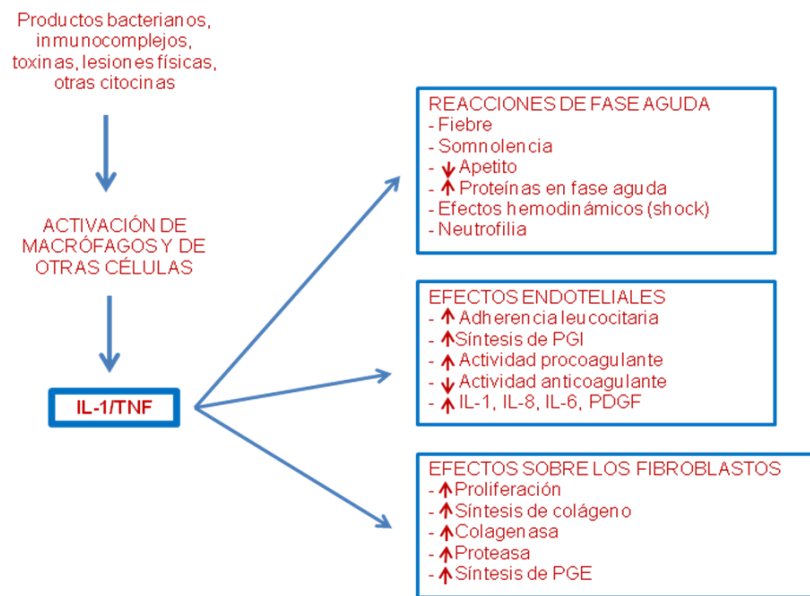


Figura 37: Efectos más importantes de IL-1 y TNF en la inflamación

Las citoquinas pueden clasificarse en base a su estructura, a su célula secretora, o a su función. Aunque con las limitaciones derivadas del pleiotropismo (muchas acciones efectuadas por una sola citoquina) y de la redundancia (diferentes citoquinas con la misma actividad) que caracterizan algunas citoquinas, parece más adecuada una clasificación basada en el principal efecto biológico de estos mediadores solubles. Así, las podemos clasificar en los siguientes grupos (Moreno R, 2002).

1. Citoquinas involucradas en inmunidad:
 - Citoquinas que median en la inmunidad innata
 - Citoquinas que median en la inmunidad adquirida
2. Quimioquinas
3. Factores de crecimiento
4. Citoquinas involucradas en la hematopoyesis

La inmunidad natural o innata comprende los mecanismos iniciales inmunes contra agentes infecciosos o células tumorales. Las principales células efectoras de la inmunidad innata son los fagocitos (neutrófilos y monocitos) y las células *natural killer* (NK), que son también las principales células secretoras de citoquinas que participan en la inmunidad innata.

El objetivo de los neutrófilos y de los monocitos incluye la fagocitosis y la muerte de microbios, así como la secreción de citoquinas con diversas funciones, mientras que las células NK son capaces de matar células tumorales y secretar citoquinas que activen a los macrófagos.

Normalmente, la inmunidad innata se desarrolla con una respuesta inflamatoria que finaliza con la eliminación del agente patógeno. Las citoquinas que participan en la inmunidad innata pueden agruparse de acuerdo a su función principal. De cualquier modo, merece la pena mencionar que la diferencia entre inmunidad innata y adquirida es de algún modo artificial y que diferentes citoquinas están implicadas en ambos tipos de inmunidad (Moreno R, 2002).

El reclutamiento de leucocitos en el lugar de la infección está mediado principalmente por citoquinas proinflamatorias, TNF- α , IL-1 y IL-6. Las consecuencias de dicho efecto son:

1. *Up-regulation* o nueva expresión de moléculas de adhesión por el endotelio, que median el reclutamiento de los leucocitos. Las moléculas de adhesión más importantes involucradas en este proceso son las ICAM-1 (CD54) y las VCAM-1 (CD106). Éstas son ligandos para integrinas expresadas por leucocitos, y la P-endotelial y la E-selectina, que interactúan con glicoproteínas expresadas por leucocitos.

2. Estimulación de la síntesis de quimioquinas por macrófagos y CE. Esta familia de citoquinas también interviene en el reclutamiento leucocitario al foco inflamatorio.

Otra citoquina que participa en el reclutamiento de leucocitos al foco inflamatorio es el INF- γ , ya que potencia muchos de los efectos del TNF- α (Sallusto F, 2008).

Las quimioquinas son pequeños péptidos que facilitan el paso de los leucocitos de la circulación a los tejidos. El prototipo de quimioquina es la citoquina IL-8. Se sintetiza en diversos tipos de células estimuladas por mediadores de la inflamación (IL-1 y TNF- α) (Dinarello CA, 2000). Su función más destacada es la atracción de leucocitos al foco inflamatorio: neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos T, monocitos-macrófagos y células NK.

IL-1 y TNF son inductores de las moléculas de adhesión endotelial, esenciales para la adhesión de leucocitos a la superficie del endotelio para emigrar posteriormente a los

tejidos, actúan sinérgicamente facilitando la quimiotaxis e incrementando la actividad de la ciclooxigenasa. El TNF- α favorece la síntesis endotelial de NO, relaja la fibra muscular lisa y produce vasodilatación. La IL-1 estimula la mielopoyesis y la producción de corticoides suprarrenales, ya que estimula la secreción de corticotropina (CRH), la hormona hipotalámica que activa la secreción hipofisaria de la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Si la inflamación ha sido inducida por infección, trauma, isquemia, células T o toxinas, tanto IL-1 como TNF inician la cascada de mediadores inflamatorios usando como diana el endotelio (Esteller A, 2007).

Las citoquinas antiinflamatorias bloquean este proceso, o al menos suprimen la intensidad de la cascada. Las citoquinas tales como IL-4, IL-10, IL-13 y el TGF- β suprimen la producción de IL-1, IL-6, TNF- α , quimioquinas como la IL-8, y moléculas de adhesión vascular. Son potentes activadores de linfocitos B, y como consecuencia son también potentes agentes antiinflamatorios (Valledor AF, 2010).

Por tanto, un balance entre los efectos de las citoquinas proinflamatorias y las antiinflamatorias determinaría el pronóstico de la enfermedad (Vilcek J, 2004).

Respuesta de las citoquinas a la inflamación

La inflamación, que es un proceso local, también se acompaña de una respuesta sistémica de interés fisiopatológico. En su génesis intervienen las citoquinas IL-1, IL-6 y TNF- α . Entre sus manifestaciones se incluyen la fiebre, la pérdida de peso, la astenia y la anorexia, el malestar general y la somnolencia. La repercusión hematológica de la inflamación incluye leucocitosis, con neutrofilia y presencia de formas inmaduras (cayados); en los procesos inflamatorios alérgicos causados por infecciones parasitarias es más frecuente la eosinofilia; y en los de origen vírico lo habitual es la linfocitosis. La intensidad de la repercusión general de la inflamación es muy variable, abarca desde cuadros clínicos leves (fiebre, incremento de reactantes de la fase aguda) hasta situaciones graves que en su conjunto constituyen el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) (Esteller A, 2007).

2.4.4.2. MOLÉCULAS DE ADHESIÓN

El papel de la inflamación en el proceso aterosclerótico se ha reconocido de forma exponencial durante los últimos años. Los mecanismos que relacionan el proceso inflamatorio con la aterogénesis y la inestabilidad de la placa de ateroma, se comprenden mejor desde la importancia de las consecuencias clínicas para identificar el gran riesgo de los pacientes y el desarrollo de las nuevas terapias antiinflamatorias, especialmente durante un proceso agudo.

Las moléculas de adhesión son, de acuerdo con la definición del *Gene Ontology Consortium*, “moléculas expresadas en la superficie de una célula que median la adhesión de dicha célula con otras células o con la matriz extracelular” (Blankenberg S, 2009). Estas proteínas ejercen numerosas funciones cruciales en la interfaz de una célula y en el ambiente que la rodea, bien sea otra célula similar o de otro tipo, o la propia matriz extracelular o incluso algunas veces elementos solubles. Las moléculas de adhesión están ampliamente distribuidas y cada célula expresa sus propias moléculas de adhesión.

Desde el punto de vista estructural se distinguen tres grandes grupos: selectinas, integrinas y superfamilia de las inmunoglobulinas (Valledor AF, 2010) (Tabla III).

Tabla III: Funciones, ligandos y distribución tisular de las moléculas de adhesión

Moléculas de adhesión	Otros nombres	Funciones		Distribución	
<i>Selectinas</i>			Endotelio	Leucocitos	Plaquetas
P-selectina	CD62P	Rodamiento	+		+
E-selectina	CD62E	Rodamiento	+		
L-selectina	CD62L	Rodamiento		+	
<i>Inmunoglobulinas</i>					
ICAM-1	CD54	Fijación	+	+	
ICAM-2	CD102	Fijación	+	+	+
ICAM-3	CD50	Fijación	+	+	
VCAM-1	CD106	Fijación	+		
PECAM-1	CD31	Extravasación	+	+	+
<i>Integrinas</i>					
Integrina α_2/β_1	CD49b/CD29	Receptor plaquetar			+
Integrina α_4/β_1	CD49d/CD29	Fijación	+		
Integrina α_L/β_2	CD11a/CD18	Fijación		+	
Integrina α_M/β_2	CD11b/CD18	Fijación		+	
Integrina α_X/β_2	CD11c/CD18	Fijación		+	
Integrina α_D/β_2	CD11d/CD18	Fijación		+	
Integrina α_2B/α_3	GPIIb/IIIa	Receptor plaquetar			+
Integrina α_V/β_3	CD51/CD61	Migración	+		+
Integrina α_V/β_5		Migración	+		

2.4.4.2.1. SELECTINAS

Son moléculas que se expresan en el endotelio y/o en los leucocitos cuya función es promover una adhesión intercelular débil en las áreas de la inflamación. Se trata de una familia constituida por tres tipos diferentes de glicoproteínas que comparten una estructura determinada. Todas ellas contienen un N-terminal (*C-type lectin domain*) , seguido por un factor de crecimiento epidérmico (EGF) como dominio, un número variable de cortos dominios repetidos, una porción corta transmembrana y un pequeño dominio citoplasmático.

Los tres miembros de la familia de las selectinas se nombran de acuerdo a su principal sitio de expresión:

- L-selectinas, expresadas en los leucocitos
- E-selectinas, que se expresan específicamente en las células endoteliales y

-
- P-selectinas, localizadas principalmente en plaquetas aunque también se expresan en células endoteliales

Estas moléculas tienen cada una un patrón específico de expresión. Las L-selectinas están presentes en casi todos los leucocitos, en algunas células T y B y en algunas células NK dependiendo de su estado de activación y son constitutivas. Por el contrario la P-selectina se almacena en los gránulos α de plaquetas inactivadas y en los cuerpos de Weibel-Palade de CE y se reclutan en la superficie celular sólo después de la activación celular. Esta disponibilidad de la molécula P-selectina en la superficie celular se obtiene en pocos minutos. Por otra parte, la E-selectina está casi ausente en el endotelio en reposo y es inducida por algunas citoquinas inflamatorias. El factor de transcripción NF- κ B parece crucial en la activación de este gen. Esta inducción lleva unas horas y desaparece rápidamente (Blankenberg S, 2009).

Los mecanismos de inactivación de estas moléculas poseen una gran relevancia. Es necesario que desaparezcan de la superficie celular después de su activación para limitar o parar el proceso inflamatorio. La sobreexpresión o el mantenimiento de estas moléculas pueden tener graves consecuencias en la inflamación y en la integridad de la pared vascular. Después de la activación celular, las selectinas son rápidamente retiradas de la superficie celular por un mecanismo de internalización y de dianas lisosomales (P- y E-selectina) o por vertido proteolítico en la hendidura (L- y E-selectina). Las isoformas solubles de E- y L-selectina, cuantificables en sangre, son los resultados del último proceso.

Todas las selectinas participan en diferentes pasos del reclutamiento de leucocitos en la superficie celular bajo fuerzas transversales: rodamiento y adhesión de leucocitos. Por interacciones con sus ligandos, las selectinas crean débiles enlaces entre las CE activadas (E- y P-selectina) y leucocitos (L-selectina). El ligando PSGL-1 de la P-selectina, dispara la activación del leucocito, la movilización de la integrina e induce inflamación y trombosis. La inhibición de la función de PSGL-1 por anticuerpos, reduce la adhesión celular y el reclutamiento en las células que expresan P-selectina. Las selectinas también participan en la amplificación del proceso de reclutamiento por

crear interacciones favorables entre plaquetas, entre plaquetas y leucocitos o entre leucocitos (Slotta JE, 2009).

2.4.4.2.2. INTEGRINAS

Son moléculas cuya denominación deriva de su propiedad de integrar el medio intracelular con el medio extracelular. Funcionalmente participan en la adhesión intercelular así como en la interacción de células con elementos de la matriz extracelular. Se encuentran en los leucocitos y se han descrito las siguientes:

- β_1 , cuya función básica es la unión de las células con elementos del tejido conjuntivo
- β_2 , que sirven para la unión con otras células
- β_3 , que forman la familia de las citoadhesinas, moléculas relacionadas con la activación plaquetaria y otros fenómenos hemostáticos
- β_7 , que desempeñan un papel esencial en la recirculación linfocitaria (Hagemeyer CE, 2010).

2.4.4.2.3. SUPERFAMILIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Estas moléculas deben su nombre al hecho de que poseen en su estructura una o más regiones similares a las de las inmunoglobulinas (Ig). Las más importantes con relación a la inflamación son la familia ICAM (moléculas de adhesión intercelulares) y la molécula VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular-1).

Las ICAM pertenecen a una subfamilia de cinco miembros. La ICAM-1 es la que se expresa mayoritariamente y puede ser estimulada por citoquinas proinflamatorias en leucocitos y CE; mientras que la ICAM-2 está presente en leucocitos, plaquetas y endotelio, pero se inhibe por mediadores inflamatorios. La ICAM-3 se ha detectado en CE y leucocitos y es la única molécula ICAM en neutrófilos. Las moléculas ICAM-1, ICAM-2 e ICAM-3 median la adhesión de leucocitos al endotelio activado, estableciendo fuertes uniones con integrinas, induciendo el reclutamiento de células inflamatorias en la superficie vascular y por tanto, participando en la extravasación de leucocitos.

La VCAM-1 es inducida en CE, pero puede expresarse también en otro tipo de células como macrófagos, mioblastos o células dendríticas. Participa en el reclutamiento de células sanguíneas por el endotelio activado, favoreciendo su firme adhesión.

La molécula de adhesión celular plaqueta endotelio-1 (PECAM-1) es otro miembro de la familia de las Ig. Se expresa en leucocitos, plaquetas y CE y está implicada en la integridad del endotelio y en la extravasación de las células desde el compartimento sanguíneo a la pared del vaso y a los tejidos (Blakenberg S, 2003), (Galkina E, 2007).

MOLÉCULAS DE ADHESIÓN: BIOMARCADORES EN PROCESOS INFLAMATORIOS

Es bien sabido que la inflamación juega un papel importante en todos los estadios del proceso aterosclerótico. Este hecho ha estimulado la búsqueda de proteínas circulantes que reflejen el proceso inflamatorio que tiene lugar en la pared del vaso e indiquen el riesgo de padecer un accidente cardiovascular. Por este motivo, en los últimos años se ha prestado especial atención al valor potencial de las moléculas de adhesión solubles como biomarcadores en la enfermedad arterial coronaria (Konstantino Y, 2007).

Una fase temprana de la aterosclerosis implica el reclutamiento de las células inflamatorias de la circulación y su migración transendotelial (Fig. 38). El reclutamiento de leucocitos es un proceso mediado predominantemente por moléculas de adhesión, las cuales se expresan en el endotelio vascular y en los leucocitos circulantes en respuesta a distintos estímulos inflamatorios. De hecho, se ha puesto de manifiesto la expresión local de moléculas de adhesión en placas de ateroma, por lo que los niveles de dichas moléculas se han postulado como indicadores de factores de riesgo en eventos cardiovasculares en la población sana (Blankenberg S, 2003), (Galkina E, 2007).

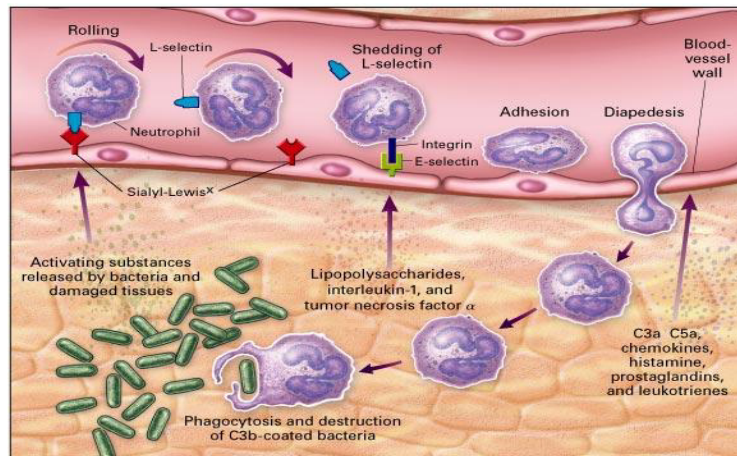


Figura 38: Rodamiento leucocitario (Delves PJ, 2000)

Se ha demostrado que existen niveles de moléculas de adhesión solubles correlacionados con varios factores de riesgo cardiovasculares como el tabaco, la HTA, bajos niveles de colesterol-HDL e hipercolesterolemia o hipertrigliceridemia. De hecho, se ha demostrado una cierta correlación de las ICAM-1 y las VCAM-1 con los lípidos en la población joven. Los resultados de un estudio llevado a cabo por Montecucco y colaboradores indican que los niveles de moléculas de adhesión solubles, especialmente de ICAM-1 y P-selectina disminuyen con el tratamiento a base de estatinas (Montecucco F, 2009).

Estas moléculas de adhesión solubles también se ven incrementadas en pacientes diabéticos y sujetos no diabéticos con resistencia a la insulina (He C, 2010).

También se ha investigado el papel de las moléculas de adhesión solubles como predictivas de accidentes cardiovasculares en personas aparentemente sanas. El primer estudio de *Atherosclerosis Risk In Communities* identificó las ICAM-1 como un predictor de futuros accidentes cardiovasculares, incluso después de tener controlados todos los posibles factores de riesgo, incluyendo las variables inflamatorias como fibrinógeno, fvW y el recuento de células blancas sanguíneas (Yilmaz H, 2006).

3. OBJETIVOS

Muchos extractos de plantas o bien sus principios activos, se siguen empleando con éxito en terapéutica para indicaciones bien definidas, aunque poco se sepa de su mecanismo de acción. Éste es el caso de algunos polifenoles como son los flavonoides. Trabajos realizados con anterioridad en nuestro departamento pusieron de manifiesto la actividad antiagregante plaquetaria de los fármacos objeto de nuestro estudio mediante la utilización de diferentes técnicas. Por un lado, se trabajó *in vitro*, aplicando la agregometría de impedancia y por otro, se empleó un modelo *in vivo* de trombosis experimental basado en la inducción de un tromboembolismo pulmonar masivo por la administración intravenosa de ADP por sus propiedades proagregantes. Los resultados fueron claramente positivos, si bien en el modelo de trombosis se podía apreciar un efecto bifásico dosis-dependiente. En cualquier caso, ante la escasez de conocimientos sobre su mecanismo de acción, se investigó una posible actuación sobre la cascada del AA a través de una posible inhibición de la COX-1. Para ello, se midió su actividad, trabajando con enzima puro de origen recombinante, comprobándose un bloqueo de dicha actividad enzimática. Seguidamente, se trató de estudiar una posible interacción sobre la propia COX plaquetaria realizando dos medidas indirectas; por un lado, la producción de malondialdehído (MDA) como metabolito del AA aplicando técnicas de espectrofotometría y por otro, midiendo la producción de tromboxano B₂ (TXB₂) por enzimo-inmunoanálisis (EIA).

El resultado fue negativo, lo que sugirió una posible incapacidad de los fármacos estudiados para acceder al interior de la plaqueta y, por consiguiente, una posible actuación sobre su superficie y más concretamente, sobre un receptor presente en la misma.

La ausencia de una nueva aportación sobre el posible mecanismo de acción junto con la hipótesis anterior, fueron determinantes para conducirnos hacia el receptor plaquetario GPIIb/IIIa. Esta glicoproteína es el receptor del fibrinógeno, siendo el mayoritario en las plaquetas activadas. Además, independientemente del estímulo que

desencadene la agregación, es el responsable de la principal vía de agregación plaquetaria y de formación de trombos.

Por tanto este trabajo pretende ser una contribución al esclarecimiento de los efectos atribuidos a ciertos flavonoides, centrándonos fundamentalmente en la justificación de un efecto antiinflamatorio vascular y su posible efecto modulador de la agregación plaquetaria. Para ello se han seleccionado diversos flavonoides, tanto geninas como heterósidos, que despertaron cierto interés en trabajos anteriores, así como otros estructuralmente similares, con el objetivo de establecer una posible relación estructura-actividad.

Con el fin de continuar con esta línea de investigación del departamento, se proponen los siguientes objetivos experimentales:

- 1- Estudiar la solubilidad de los flavonoides naringenina y naringina, quercetina y rutina y por último diosmetina y diosmina, para alcanzar una concentración equivalente a la dosis utilizada en terapéutica, con el fin de establecer un modelo experimental de estudio en plaquetas mediante citometría de flujo.
- 2- Estudiar el porcentaje de ocupación que presenta el receptor GPIIb/IIIa expresado por las plaquetas, en presencia de los flavonoides naringina y naringenina, quercetina y rutina, así como diosmetina y diosmina.
- 3- Estudiar la capacidad antiagregante plaquetaria que poseen dichos flavonoides.
- 4- Estudiar la capacidad inmunomoduladora de los flavonoides objeto de estudio sobre las células mononucleares de sangre periférica mediante el estudio de mediadores proinflamatorios capaces de intervenir en la agregación plaquetaria.
- 5- Estudiar de forma comparativa la relación que existe entre la estructura química y la capacidad inmunomoduladora y antiagregante plaquetaria de los heterósidos respecto de las geninas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. MUESTRAS UTILIZADAS

El reclutamiento de los individuos se realiza entre los estudiantes de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Alcalá, con consentimiento informado. Se trata de 40 sujetos sanos, no fumadores, de edades comprendidas entre 18 y 23 años, de ambos sexos, y no sometidos a ningún tratamiento farmacológico en los 15 días previos.

4.2. EXTRACCIÓN Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La extracción de las muestras se lleva a cabo en el Hospital Príncipe de Asturias, en colaboración con el servicio de Hematología. Tanto para los análisis mediante citometría de flujo como para el estudio de citoquinas se emplea sangre completa. La sangre se obtiene por punción antecubital con agujas Venoject 206x1, $1/2$ (*Terumo*) y tubos de vacío Vacutainer (*Becton-Dickinson*) con una capacidad de 4.5 ml que se presentan siliconados y cargados con citrato sódico al 3.8%, lo que permite evitar la coagulación de la sangre. Las agujas Venoject se encuentran biseladas en ambos extremos y se ajustan a un adaptador que sirve de soporte al tubo Vacutainer.

Se recoge una media de diez tubos por extracción, equivalente a un volumen de 45 ml. Los tubos llenos se voltean varias veces para evitar posibles coágulos y se mantienen cerrados a temperatura de 4°C en hielo convencional hasta ser utilizados. La sangre obtenida se homogeniza en un vaso de precipitados de propiletileno y se reparte en alícuotas de 1 ml en tubos Falcon antihumectantes de poliestireno (4.5 ml, *Dismadel*). Todas las muestras se preparan por duplicado.

4.3. FÁRMACOS UTILIZADOS

Los polifenoles utilizados en estos ensayos se incluyen dentro del grupo de los flavonoides. Se ha estudiado el comportamiento de diosmina, naringina y rutina, así como de sus geninas, diosmetina, naringenina, y quercetina (Tabla IV). Todos los productos se ensayaron a las concentraciones de 0.05, 0.1, 0.5, 1, y 2 mM. La

concentración de fármaco utilizada se aproxima a la concentración terapéutica de diosmina (flavonoide registrado bajo el nombre de Daflón®).

Tabla IV: Relación de flavonoides empleados, pesos moleculares (Pm), y laboratorios proveedores.

PRODUCTO	Pm	LABORATORIO
Diosmetina	300.26	Extrasynthèse
Diosmina	680.54	Extrasynthèse
Naringenina	272,3	Zoster (Ferrer)
Naringina	580,5	Zoster (Ferrer)
Quercetina	302.23	Sigma-Aldrich
Rutina	610.51	Extrasynthèse

Las disoluciones de cada producto a las distintas concentraciones se obtienen calculando el peso para un volumen de 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO). En algunos casos se requiere la utilización de un baño de ultrasonidos para favorecer la disolución de los flavonoides. A continuación, 2µl de cada disolución se añaden a los correspondientes tubos de sangre. Todas las muestras se preparan por duplicado y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente (18°-25°C), en ausencia de luz.

4.4. ESTUDIO DE PLAQUETAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El estudio de las plaquetas se lleva a cabo utilizando un citómetro de flujo Fac Dickinson equipado con cuatro fluorescencias. El análisis de los resultados se lleva a cabo mediante un software de análisis FlowJo (*Treestar*).

La citometría de flujo es una técnica utilizada para contar, examinar o clasificar partículas microscópicas suspendidas en la corriente de un fluido. Permite un análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas o químicas de las partículas o, en este caso, de las células sanguíneas.

El fundamento de la citometría de flujo radica en un haz de luz de una longitud de onda determinada. En general, se utilizan lámparas de mercurio, xenón, rayos láser (argón o kriptón) y diodos de láser, existiendo una gran variedad de fuentes y selección de longitudes de onda según el nivel del instrumento y el diseño de los fabricantes. Este rayo de luz se proyecta hacia una célula óptica intercalada en un sistema de flujo de un fluido que lleva células en suspensión. Una parte del haz de luz seguirá su

camino hacia delante y se podrá medir mediante un detector colocado en línea con el mismo (*forward scatter detector*) y perpendiculares a la célula óptica se pueden colocar otros detectores (*side scatter detectors*), que medirán la luz dispersada y pueden ser alternativos o simultáneos según la complejidad del aparato.

Cuando las células marcadas con un AcMo unido a una molécula fluorescente interceptan el haz de luz, lo dispersan y los fluoróforos se excitan a un nivel de energía superior. Esta energía se emite en forma de fotones de luz, con unas características espectrales especiales de los diferentes fluoróforos utilizados.

En este caso la lectura del flujo es célula a célula, en tanto que en la fotometría convencional la lectura es global de todas las moléculas de la disolución. Las lecturas se evalúan y se transforman en información -imágenes y datos cuantitativos- mediante tecnología informática y software adecuados. Los resultados se expresan con datos numéricos y gráficos en forma de histogramas monodimensionales y, según los equipos, en histogramas de dos y tres dimensiones y en diferentes colores.

El citómetro utilizado para la realización de este trabajo se encuentra ubicado en el Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la Universidad de Alcalá, en un habitáculo en condiciones de presión y temperatura constantes.

4.4.1. REACTIVOS EMPLEADOS

Se utiliza un kit comercial (*Biocytex*) de ocupación del receptor plaquetar GPIIb/IIIa mediante citometría de flujo.

Tabla V: Reactivos utilizados y función que desempeñan

REACTIVOS	FUNCIÓN
reactivo 1	Diluyente
reactivo 2 ^a	control negativo
reactivo 2b	anti-GPIIIa (mab1)
reactivo 2c	anti-GP IIIa (mab2)
reactivo 3	suspensión calibradora
reactivo 4	emisor de fluorescencia

Los reactivos se almacenan a una temperatura entre 2° y 8°C. Todos ellos contienen azida sódica como conservante. El tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre y su tratamiento no superó en ningún caso los 30 minutos.

Reactivo 1. Un vial de 15 ml que contiene un diluyente diez veces concentrado. La estabilidad, una vez abierto el vial, es de dos meses a una temperatura entre 2° y 8°C, siempre libre de posibles contaminaciones. Con este vial se prepara una dilución 1:10 con agua destilada. El volumen final de la dilución depende de las necesidades concretas en función del número de muestras a estudiar. La estabilidad después de haber realizado la dilución es de quince días, a una temperatura comprendida entre 2° y 8°C.

Reactivo 2a. Un vial de 200 µl que contiene el control negativo. Es un anticuerpo monoclonal de ratón, una IgG. Se presenta listo para ser utilizado. La estabilidad una vez abierto el vial es de dos meses, a una temperatura comprendida entre 2° y 8°C y libre de posibles contaminaciones.

Reactivo 2b. Un vial de 200 µl que contiene el anticuerpo monoclonal 1, denominado Mab1. Es un anti-GPIIIa (CD61). Se presenta listo para ser utilizado. La estabilidad una vez abierto el vial es de dos meses, a una temperatura comprendida entre 2° y 8°C y libre de posibles contaminaciones.

Reactivo 2c. Un vial de 200 µl que contiene el anticuerpo monoclonal 2, denominado Mab2. Es un anti-GPIIIa (CD61). Se presenta listo para ser utilizado. La estabilidad una vez abierto el vial es de dos meses, a una temperatura comprendida entre 2° y 8°C y libre de posibles contaminaciones.

Reactivo 3. Un vial de 400 µl que contiene la suspensión calibradora con microesferas. Estas microesferas se encuentran recubiertas de una cantidad conocida de inmunoglobulinas IgG de ratón. El número de IgG que recubre cada población de microesferas viene especificado en los valores que aporta cada kit concreto con el fin de realizar la recta de calibrado.

Este reactivo se presenta listo para ser utilizado. El vial debe agitarse vigorosamente, a ser posible en un vórtex, con el fin de que estén resuspendidas y separadas todas las microesferas antes de que se abra el vial. Una vez abierto, su estabilidad es de dos

meses, a una temperatura comprendida entre 2° y 8°C y libre de posibles contaminaciones.

Reactivo 4. Un vial de 800 µl que contiene un anti-anticuerpo policlonal de ratón, una IgG-FITC. La unión a este anti-anticuerpo produce fluorescencia. El reactivo se presenta dispuesto para su inmediata utilización. Su estabilidad una vez abierto es de dos meses, a una temperatura comprendida entre 2° y 8°C y libre de posibles contaminaciones.

4.4.2. ESTUDIO DE OCUPACIÓN DEL RECEPTOR GPIIb/IIIa

Los productos se ensayan a las concentraciones: 0.05, 0.1, 0.5, 1 y 2mM, para lo cual son disueltos en DMSO y adicionados a su tubo de sangre correspondiente incubándose durante 30 min a 18-20°C en ausencia de luz. Los reactivos se mantienen a temperatura ambiente en todo momento y para cada serie, se efectúa una curva de calibración. Los reactivos se incorporan a cada tubo problema con el volumen de sangre requerido. Uno de los tubos sólo contiene el reactivo 3, la suspensión de microesferas calibradoras.

Los tubos se agitan en un vórtex, a baja velocidad para evitar la fragmentación mecánica de las plaquetas. A continuación, se incuban a temperatura ambiente (18-20°C), durante 20 minutos. Tras la incubación, se añade a todos los tubos el reactivo que produce la fluorescencia, se agita y se incuba de nuevo durante 10 minutos.

Una vez preparadas las muestras, se mantienen entre 2-8°C hasta la realización del análisis por citometría de flujo.

El estudio consiste en un análisis mediante fluorescencia en citometría de flujo, del receptor glicoproteico IIb/IIIa. El número total y el número de receptores libres en la plaqueta se determinan por conversión de la intensidad de fluorescencia en el correspondiente número de sitios por plaqueta, basándonos en una curva de calibración estándar. Se emplean diagramas bidimensionales de puntos llamados universalmente *dot-plots*. En abscisas se representa el tamaño y en ordenadas la complejidad celular. Se utiliza la escala logarítmica para localizar las plaquetas objeto de estudio. La calibración del aparato se realiza utilizando la solución de microesferas

(reactivo 3). Se selecciona la región (R2) donde aparecen las microesferas (Fig. 39) para poder estudiarlas en un histograma de fluorescencia (Fig. 40) para fluoresceína isotiocianato (FITC). A continuación se procede a la obtención de la recta de calibración con número de receptores conocido por microesfera.

Tras el estudio de la correspondiente media de intensidad de fluorescencia (MFI) de los cuatro picos (A, B, C, D) que aparecen en el histograma, se realiza una interpolación según el número de sitios aportados por el fabricante.

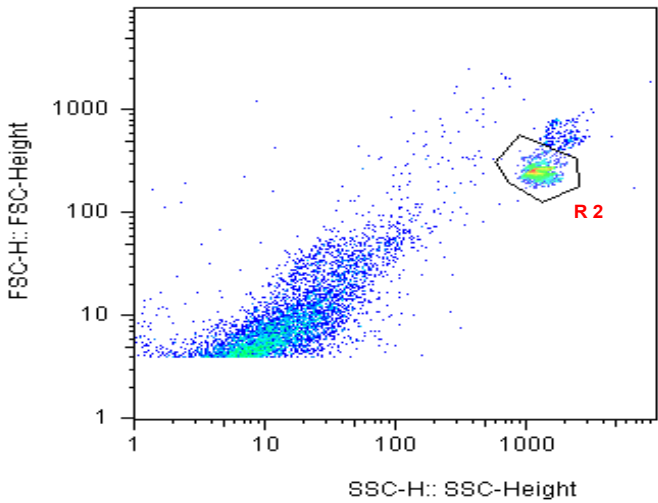


Figura 39: Región de la población R2

La recta de calibración se calcula con los resultados de los correspondientes picos de fluorescencia, obteniéndose un coeficiente de correlación (R). Se considera que el experimento se ha realizado correctamente cuando R es superior a 99.5% (Fig. 40).

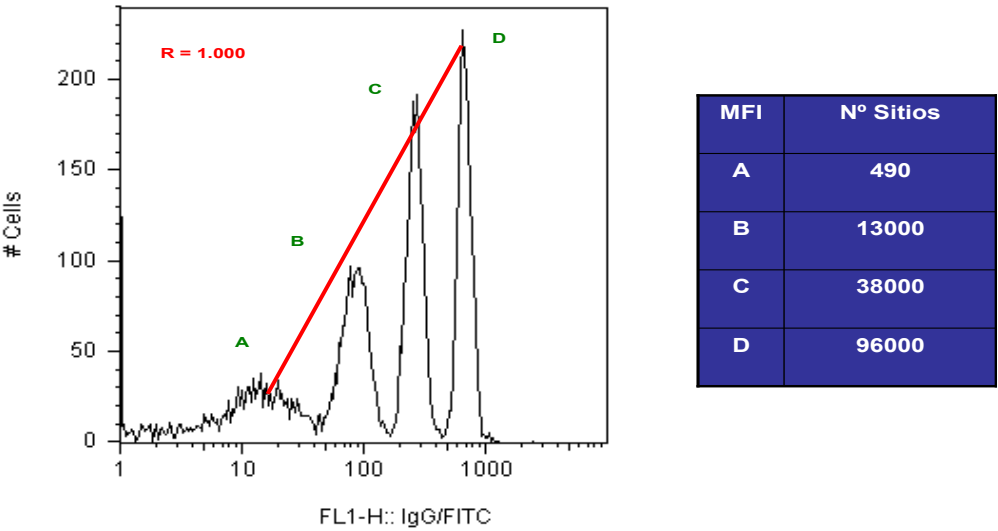


Figura 40: Recta de calibración para los picos de fluorescencia

En los histogramas de la figura 41 se refleja la intensidad de la fluorescencia emitida por las plaquetas tras la unión del anticuerpo correspondiente.

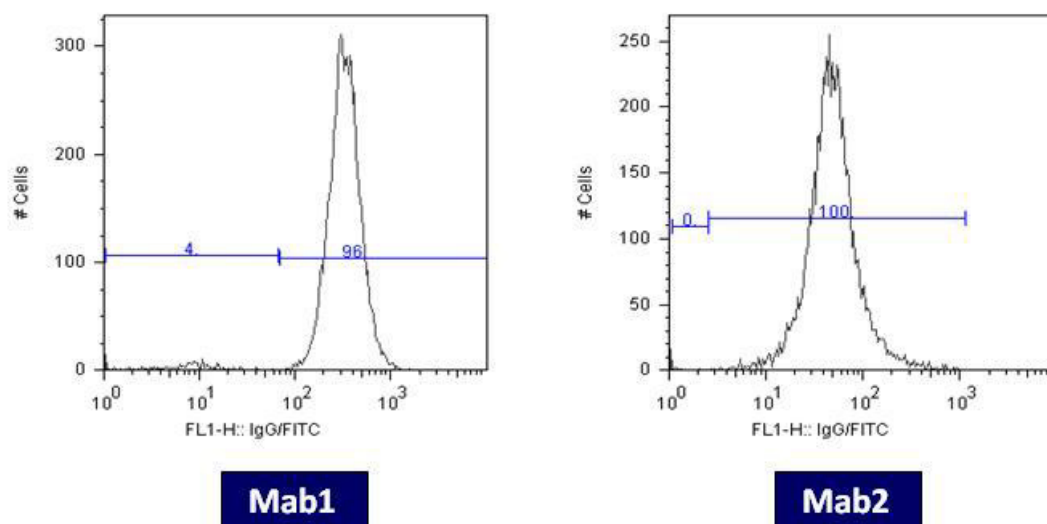


Figura 41: Fluorescencias emitidas por los anticuerpos secundarios al unirse a los anticuerpos primarios (Mab1 ó Mab2)

Esta fluorescencia es la emitida por los anticuerpos secundarios al unirse al anticuerpo primario siempre y cuando éste se encuentre unido al receptor y no haya sido desplazado por el producto objeto de estudio.

Mab1 y Mab2 reconocen epítomos diferentes del receptor. Mab1 se une a todo el complejo de la glicoproteína, pero no interfiere en el lugar de unión de Mab2, es decir, no lo desplaza, permitiéndole su unión incluso al mismo tiempo. Mab2 se une específicamente a una zona de la subunidad IIIa y su actuación tampoco es incompatible con la de Mab1 (Fig. 42).

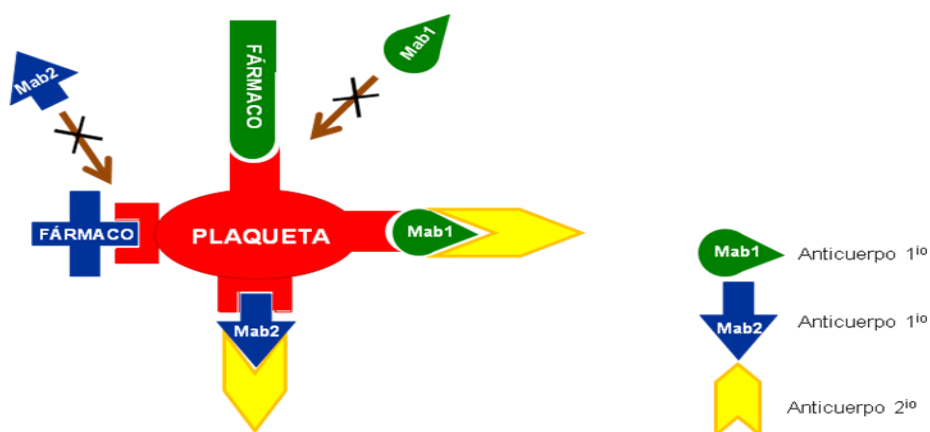


Figura 42: Ocupación de los receptores GPIIb/IIIa

CONTROLES POSITIVOS

Los controles positivos empleados para estos ensayos son fármacos comercializados capaces de llevar a cabo estos dos tipos de unión al receptor: abciximab y eptifibatida (Fig. 43). La inhibición plaquetaria depende de la concentración del fármaco en cuestión.

Eptifibatida. Es un péptido cíclico basado en una secuencia Lys-Gly-Asp (KGD) en forma de hélice, en lugar de la secuencia RGD del fibrinógeno. Es un inhibidor específico de la glucoproteína IIb/IIIa. Contiene 6 aminoácidos con grupos amido cisteína y mercaptopropionilo, que se unen al receptor plaquetario GPIIb/IIIa. De esta forma, inhibe reversiblemente la agregación plaquetaria al impedir la unión del fibrinógeno, del fvW y de otros ligandos de adherencia, a los receptores GPIIb/IIIa.

La eptifibatida se une específicamente a una zona de la subunidad IIIa, al igual que lo hace el anticuerpo monoclonal del kit, Mab2 (reactivo 2c). Compiten por el mismo sitio de unión; sin embargo, abciximab se une a todo el complejo del receptor compitiendo con Mab1 (reactivo 2b), aunque no por ello impide la unión de eptifibatida o en su defecto, de Mab2.

Abciximab. Es el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal quimérico 73E específico del receptor GPIIb/IIIa de la superficie de las plaquetas humanas activadas. Inhibe la agregación plaquetaria evitando la unión del fibrinógeno, del fvW y de otras moléculas de adhesión, al receptor GPIIb/IIIa en las plaquetas activadas.

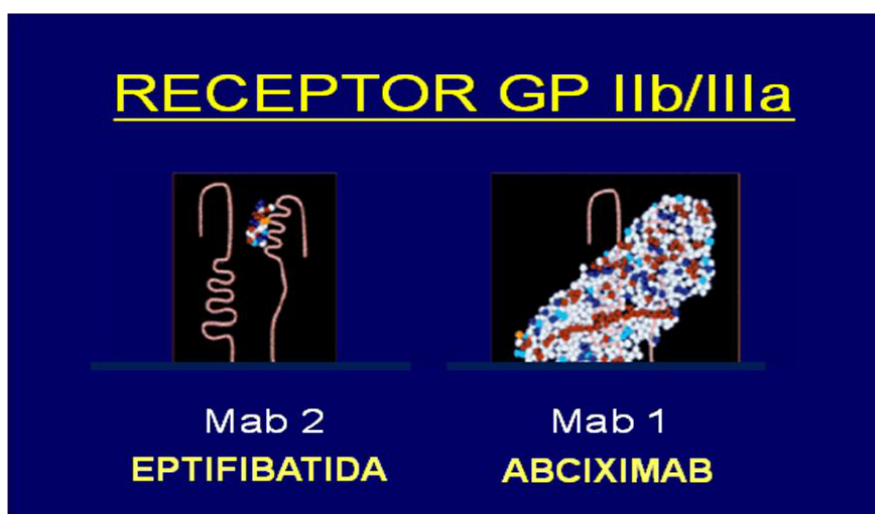


Figura 43: Mecanismo de unión de los controles positivos al receptor GPIIb/IIIa (Sitges M, 2000)

CÁLCULO DEL NÚMERO DE RECEPTORES OCUPADOS POR LOS FLAVONOIDES OBJETO DE ESTUDIO

A continuación se describe el cálculo de sitios de unión del receptor que se encuentran ocupados. En primer lugar se mide la intensidad de fluorescencia generada cuando Mab1 ó Mab2 se encuentran ocupando el receptor. Se considera que el número total de receptores que tiene la plaqueta es igual al número de receptores que se ocupaban con Mab1 ó con Mab2 en ausencia de fármaco. El número de receptores libres, en presencia de fármaco, es igual al número de receptores del tipo que ha disminuido, es decir, si el fármaco efectúa una unión tipo Mab1, el número de receptores que no han sido ocupados por nuestro compuesto, sería el número de receptores que ocupa Mab1.

Así pues, los receptores GPIIb/IIIa bloqueados por nuestro producto son el resultado de la diferencia entre el número total de receptores y el número de receptores libres.

En la tabla VI se resume el cálculo del número de receptores ocupados.

Tabla VI: Cálculo del número de receptores ocupados por nuestros productos.

TIPO DE UNIÓN	Nº TOTAL DE RECEPTORES	Nº DE RECEPTORES LIBRES	Nº DE RECEPTORES OCUPADOS POR LOS FLAVONOIDES
Mab 1	Mab 2	Mab 1	Mab 2 – Mab 1
Mab 2	Mab 1	Mab 2	Mab 1 – Mab 2

4.4.3. ESTUDIO DE LOS CAMBIOS MORFOLÓGICOS DE LAS PLAQUETAS

Como agonista del receptor GPIIb/IIIa se emplea un potente agente proagregante, ionóforo de calcio (A23187) 25mM disuelto en DMSO. El objetivo es comprobar si los flavonoides se comportan como agonistas parciales, neutralizando en parte la acción del ionóforo de calcio.

Los productos son disueltos en DMSO y llevados a una concentración final 2mM en su correspondiente tubo de sangre. Las muestras se preparan por duplicado y se incuban durante 30 min a 18-20°C. A continuación se añade el ionóforo de calcio a la mitad de los tubos y se incuba 30 min a 18-20°C. Los reactivos se mantienen a temperatura ambiente en todo momento y para cada serie, se efectúa una curva de calibración, al igual que en el ensayo anterior. Los reactivos se incorporan a los correspondientes

tubos problema. Uno de los tubos sólo contiene el reactivo 3 puesto que es la suspensión de microesferas calibradoras.

Los tubos se agitan en un vórtex, a baja velocidad para evitar la fragmentación mecánica de las plaquetas. A continuación, se incuban a temperatura ambiente (18-20°C), durante 20 min. Tras la incubación, se añade a todos los tubos el reactivo que produce la fluorescencia, se agita y se incuba de nuevo durante 10 min.

Una vez preparadas las muestras, se mantienen entre 2-8°C hasta la realización del análisis por citometría de flujo.

Utilizando el procedimiento de adquisición del citómetro de flujo, en el diagrama de *forward-side* frente a SS log se aíslan las plaquetas en tres regiones, separándolas de las demás células presentes en las muestras de sangre completa (Fig. 44). Se observa una distribución de las plaquetas en tres regiones diferentes, la región 1 donde se encuentran los agregados, la región 2, correspondiente a las plaquetas, y la región 3, en la cual se visualizan micropartículas derivadas de las plaquetas (PMPs).

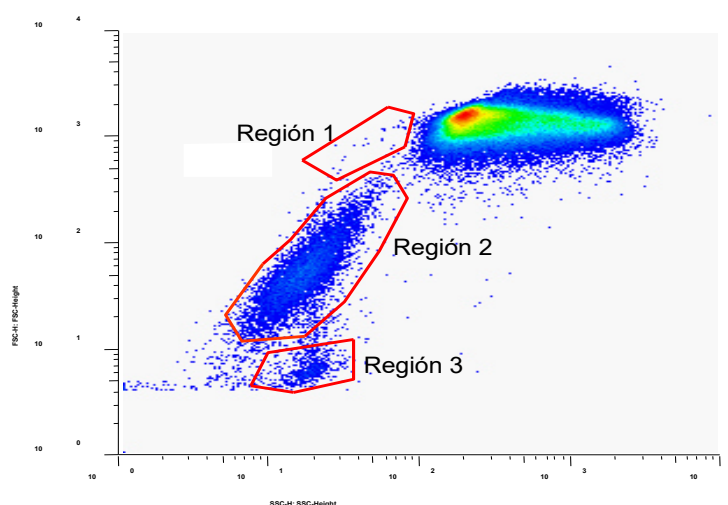


Figura 44: Diagrama de distribución de las distintas poblaciones de plaquetas

4.5. ESTUDIO DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

Los materiales y la metodología de los ensayos por EIA son comunes a todas las citoquinas con las que se ha trabajado, IL-1 β y TNF- α . Se emplea un kit comercial (Amersham) de detección de citoquinas humanas por el método de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*. Ensayo por inmuno absorción ligado a enzimas).

El estudio se basa en la unión de anticuerpos conjugados con enzimas para la detección cuantitativa de las distintas citoquinas presentes en plasma, seleccionadas para este estudio.

4.5.1. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Buffer de lavado. Se presenta en una botella de 25 ml. Buffer lavador concentrado aproximadamente 20x. PBS 1% y Tween 20%. 25 ml del buffer lavador concentrado se diluyen en 500 ml de agua destilada. A continuación se agita con suavidad para evitar la formación de espuma y se ajusta el pH a 7,4.

Placa. Placa con pocillos con anticuerpos monoclonales murinos para la citoquina adheridos a la superficie, anticuerpo conjugado unido a biotina (anticuerpo monoclonal anti-citoquina) y Streptavidina –HRP. Todo ello liofilizado. La placa se conserva en todo momento a -20°C y en ausencia de luz hasta su uso inmediato.

Sustrato. Un vial de 15 ml con la disolución del sustrato, tetrametil-benzidina.

Diluyente. Un vial de 12 ml para la dilución de cada muestra.

Solución para parar la reacción (*stop solution*). Un vial de 15 ml con ácido sulfúrico 1M para detener la reacción final.

4.5.2. PROCEDIMIENTO

Para estimular la producción de citoquinas se emplea LPS. Se prepara una disolución de LPS a fin de obtener una concentración final de 10 µg/ml en sangre. Los productos a ensayar se incuban previamente a 37°C durante 30 min en sangre completa, preservados de la luz, en un baño con agitación constante. Se añaden 2 µl de LPS a cada tubo, excepto en el blanco, donde se igualan los volúmenes con DMSO y se incuban durante 6 horas a 37°C en un baño con agitación constante.

A continuación, las muestras se introducen en un recipiente con hielo durante cinco minutos para frenar la reacción y se centrifugan (Centrífuga JOUAN modelo B3.11) durante 10 min a 4000 rpm de forma progresiva. Se recoge el sobrenadante de cada tubo con una micropipeta de 200 µl, y se deposita en un ependorf. Las muestras se

preparan por duplicado y al final se homogenizan los plasmas obtenidos de cada una de ellas, recogiénose un total de 500-800 µl de plasma por cada muestra. Cada estándar y cada blanco se realizan por duplicado, y cada muestra y control, por cuadruplicado.

Seguidamente, se añaden 150 µl de agua destilada a todos los pocillos de los estándares y a los que contienen el blanco; por otra parte se añaden 100 µl de agua destilada en los pocillos correspondientes a las muestras y controles. Una vez completada la placa con las cantidades determinadas de agua destilada, se depositan 50 µl de cada muestra y control opcional en los lugares designados previamente. Se cubre la placa y se incuba a temperatura ambiente (18-25°C) durante tres horas en un agitador de placas a 200 rpm.

Se retira la placa del agitador y se vacían los pocillos. A continuación se procede al lavado de los pocillos (3 veces, 400 µl de buffer de lavado), aspirando el contenido del pocillo en cada lavado. Este proceso se lleva a cabo con la mayor precisión en un lavador de placas automático con sistema multicanal (*ELx50 Auto Strip Washer de BioTek*). Después del último lavado y con los pocillos ya vacíos, se tapa la placa con papel absorbente para eliminar el exceso de buffer, y se continúa inmediatamente el ensayo con el fin de evitar el secado de los pocillos.

Seguidamente se añaden 100 µl de la disolución TMB de sustrato en todos los pocillos, incluyendo los blancos, se tapa la placa y se incuba a temperatura ambiente (18-37°C) durante 15 min en un agitador de placas (*Rotabit p-selecta*) a 200 rpm, en ausencia de luz. A continuación se detiene la reacción enzimática mediante la adición de 100 µl de H₂SO₄ 1 M en todos los pocillos y se procede a la lectura de la absorbancia (Espectrofotómetro *ELx800 Absorbance Microplate Reader de Biotek*) a 450 nm.

4.5.3 REACCIÓN INMUNO-ENZIMÁTICA

Cada uno de los pocillos de la placa contiene un anticuerpo monoclonal de cobertura anti-citoquina. La citoquina presente en la muestra provoca uniones estándar con los anticuerpos adheridos en los pocillos, y a su vez, el anticuerpo conjugado con biotina

(un anticuerpo monoclonal anti-citoquina) se une a la citoquina. Por último, la Streptavidina-HRP se une a la biotina.

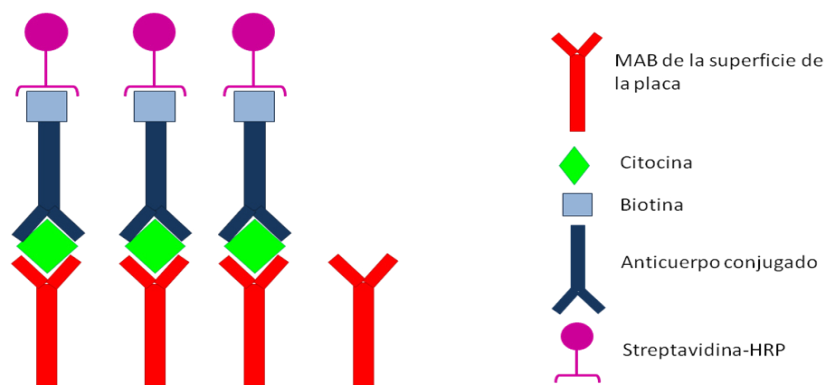


Figura 45: Esquema de la reacción inmuno-enzimática como consecuencia de la producción de citoquina

Con el fin de eliminar las partículas que no participan en la reacción inmuno-enzimática, se lleva a cabo un lavado tras el cual se añade el sustrato, que forma un producto coloreado en proporción a la cantidad de citoquina presente en la muestra. El proceso termina con la adición de ácido para frenar la reacción y producir el viraje colorimétrico. La absorbancia se mide a 450 nm.

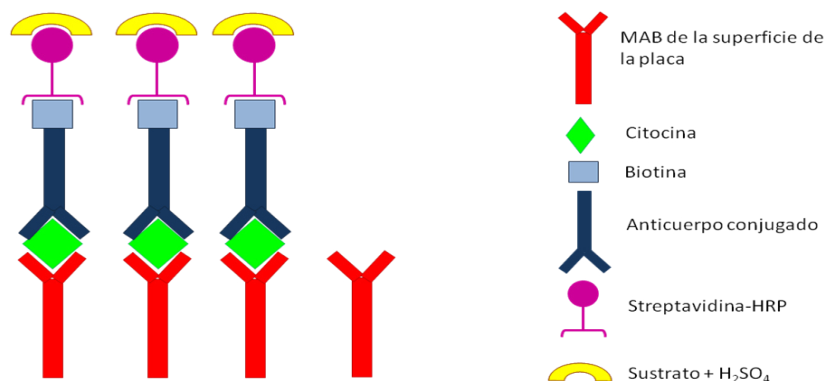


Figura 46: Esquema de la reacción de coloración debida a la producción de citoquina

4.6. ESTADÍSTICA

Debido a que las muestras no se ajustan a una curva de normalidad, se utiliza el test no paramétrico para muestras independientes U de Mann Whitney. Los resultados son expresados como la Media y el error estándar de la Media. Se utiliza un nivel de

significación en todo el trabajo de menos de 0,05. Para todo el trabajo estadístico se emplea el software SPSS-14.00. Para las muestras dependientes se utiliza el test de Wilcoxon.

5. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos en los estudios realizados:

Estudios de disolución de los flavonoides mediante citometría de flujo

Estudio de la ocupación del receptor GPIIb/IIIa mediante citometría de flujo

Estudio de agregación plaquetaria en presencia y ausencia de ionóforo de calcio mediante citometría de flujo y del efecto de los flavonoides sobre la morfología de las plaquetas mediante microscopía de fluorescencia.

Estudio del efecto de los flavonoides sobre la liberación de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α mediante EIA.

5.1. ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN

El receptor GPIIb/IIIa posee dos sitios de fijación (SF) diferentes donde se unen abciximab (SF1) y eptifibatida (SF2), fármacos empleados como controles en los experimentos que se describen a continuación.

A la hora de seleccionar el disolvente adecuado para la realización de los ensayos se encontraron algunas dificultades. Entre ellas cabe destacar la escasa solubilidad de los flavonoides, las restricciones en el uso de ciertos disolventes que presenta la técnica de citometría de flujo, así como la fragilidad de las plaquetas.

El primer disolvente empleado fue DMSO, con el cual se conseguía una perfecta disolución de los productos; sin embargo, a las proporciones empleadas (10 μ l de DMSO en 1ml de sangre) se observaron alteraciones considerables en la estructura de las plaquetas.

A continuación se emplearon los siguientes disolventes: etanol 25%, etanol 50%, etanol 100%, metanol 25%, metanol 50% y metanol 100%.

Los productos seleccionados para estos ensayos fueron: eptifibatida y los flavonoides diosmina y quercetina.

La concentración de flavonoides utilizada para los ensayos está próxima a la dosis de diosmina (Daflón®) empleada en terapéutica, realizándose dichos ensayos con concentraciones 0.5 mM.

Ocupación del receptor GPIIb/IIIa en sangre completa, en presencia y ausencia de alcohol

En las muestras blanco de sangre completa no hay ocupación del receptor GPIIb/IIIa. En cambio, cuando se añade el disolvente el grado de ocupación del receptor aumenta en relación directamente proporcional a la concentración de alcohol empleada (Fig. 47).

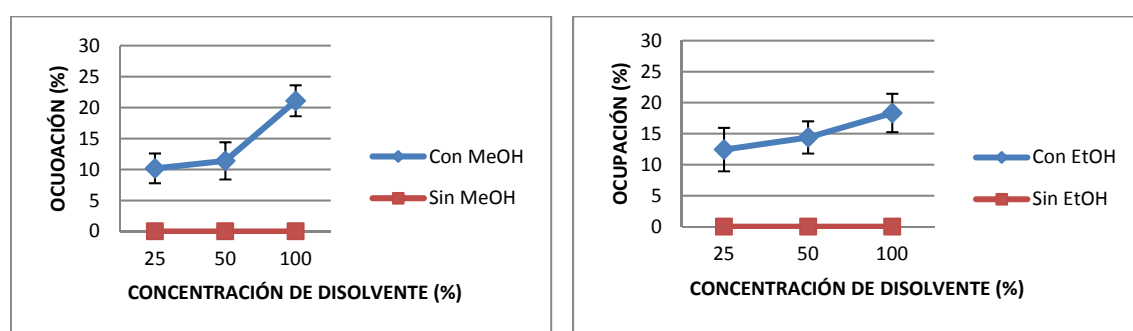


Figura 47: Grado de ocupación del receptor GPIIb/IIIa en presencia de metanol y etanol.

- ◆— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas en presencia de etanol y metanol.
- Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas en ausencia de etanol y metanol.

5.1.1. Ocupación del receptor GPIIb/IIIa por eptifibatida utilizando como disolventes diferentes mezclas hidroalcohólicas

El grado de ocupación del receptor, a una misma concentración de eptifibatida, aumenta a medida que aumenta la concentración de disolvente (Figura 48).

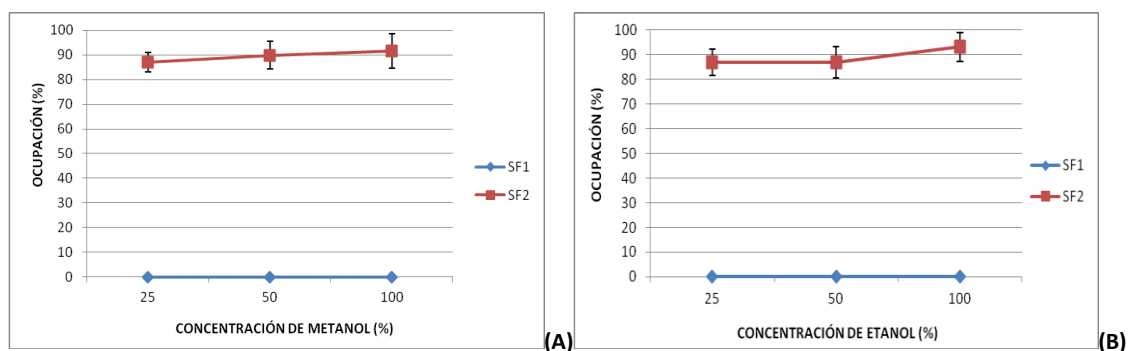


Figura 48: Grado de ocupación del receptor GPIIb/IIIa por eptifibatida empleando distintas concentraciones de metanol (A) y etanol (B).

◆ Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF2 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por eptifibatida

■ Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF1 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas.

5.1.2. OCUPACIÓN DEL RECEPTOR GPIIB/IIIA EN PRESENCIA DE DIOSMINA Y QUERCETINA UTILIZANDO COMO DISOLVENTES DIFERENTES MEZCLAS HIDROALCOHÓLICAS

La ocupación del receptor aumenta a medida que aumenta la concentración de disolvente (Fig. 49).

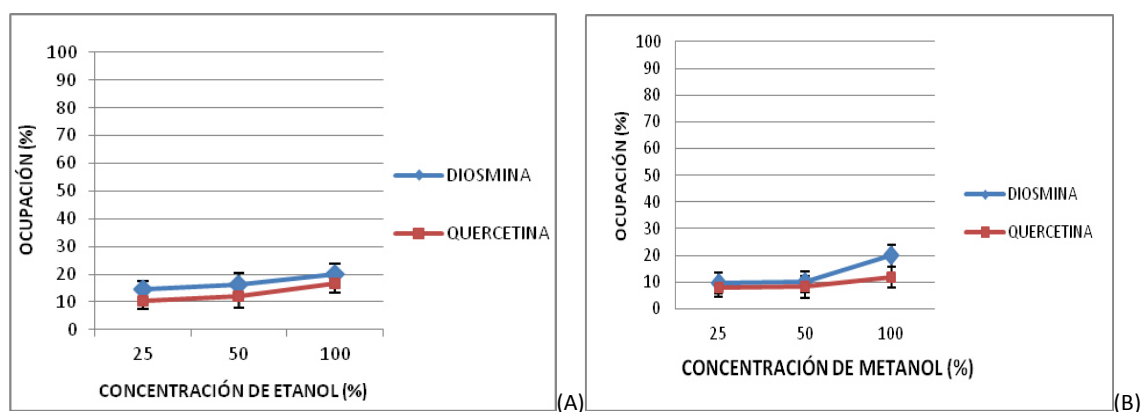


Figura 49: Grado de ocupación del receptor GPIIb/IIIa en presencia de diosmina y quercetina 0.5 mM en etanol y metanol.

◆ Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas en presencia de diosmina disuelta en etanol (A) y metanol (B) a distintas concentraciones.

■ Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas en presencia de quercetina disuelta en etanol (A) y metanol (B) a distintas concentraciones.

Los resultados obtenidos indican que tanto etanol como metanol modifican la unión de los anticuerpos al receptor GPIIb/IIIa, lo cual, asociado a la imposibilidad de aumentar la concentración de los flavonoides por su escasa solubilidad en los alcoholes, sugiere la necesidad de emplear otro disolvente. Posteriormente se estudió la disolución de los productos en DMSO empleando la mínima proporción posible (2µl de DMSO en 1ml de sangre), y una vez comprobado que no producía alteraciones en las plaquetas (Fig. 50) se decidió emplearlo como disolvente de nuestros productos.

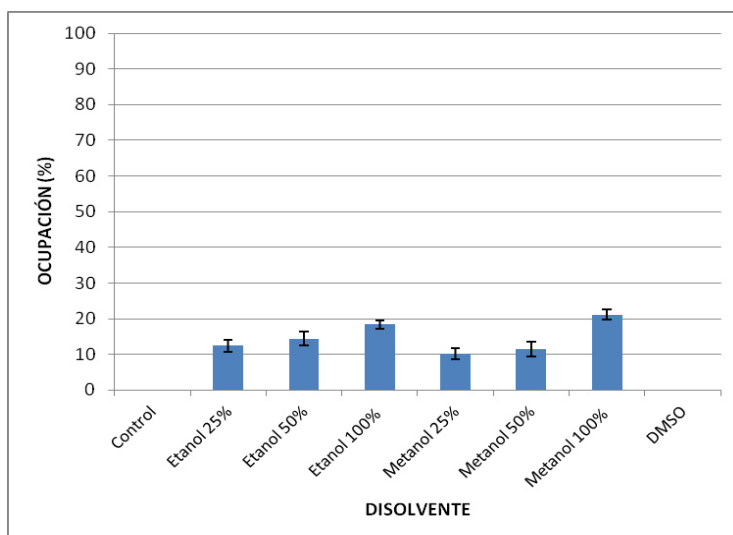


Figura 50: Grado de ocupación del SF2 del receptor GPIIb/IIIa en presencia de los distintos disolventes.

■ Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del receptor GPIIb/IIIa en presencia de cada uno de los disolventes ensayados.

5.2. ESTUDIOS DE OCUPACIÓN DEL RECEPTOR GPIIb/IIIa

Para llevar a cabo el estudio de ocupación del receptor GPIIb/IIIa se han utilizado abciximab y eptifibatida como controles positivos. Ambos fármacos se unen a SF1 y SF2 respectivamente, comportándose como antagonistas del receptor GPIIb/IIIa.

Abciximab

Se parte de la concentración utilizada en terapéutica (3,5 $\mu\text{g/ml}$). Se realiza la curva patrón ensayando seis concentraciones incluida la dosis terapéutica. Los resultados obtenidos demuestran que la mayor ocupación se obtiene con la concentración de 35 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 51), que se empleará como control positivo de SF1.

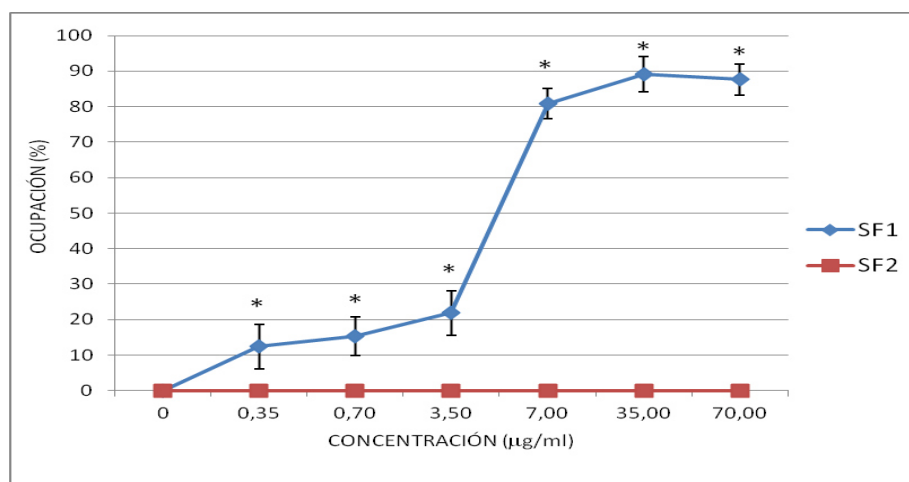


Figura 51: Curva patrón del control positivo **abciximab**.

—◆— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF1 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de abciximab a distintas concentraciones

—■— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF2 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de abciximab a distintas concentraciones.

* $p < 0,05$ representa las diferencias significativas de cada concentración respecto de la situación basal.

Eptifibatida

Se parte de la concentración utilizada en terapéutica (2,52 $\mu\text{g/ml}$). Se realiza la curva patrón ensayando seis concentraciones incluida la dosis terapéutica. Los resultados obtenidos demuestran que la mayor ocupación se produce con la concentración de 12,6 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 52), que se empleará como control positivo de SF2.

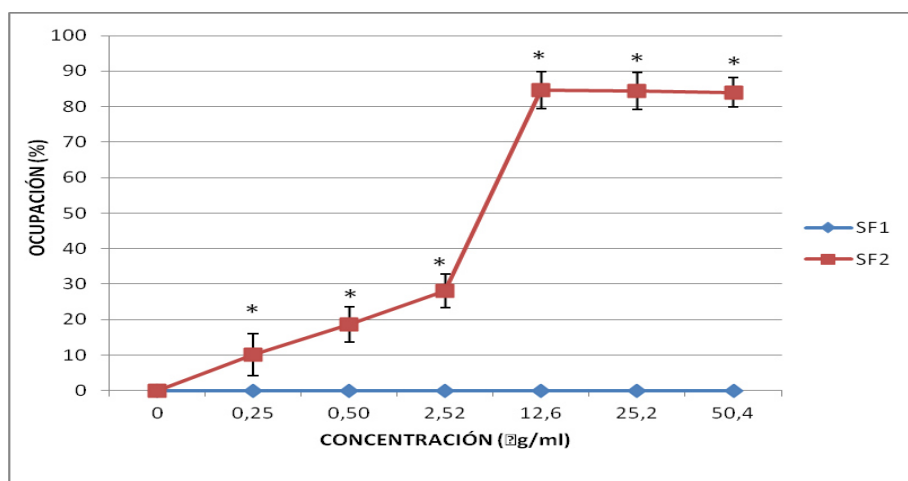


Figura 52: Curva patrón del control positivo eptifibatida.

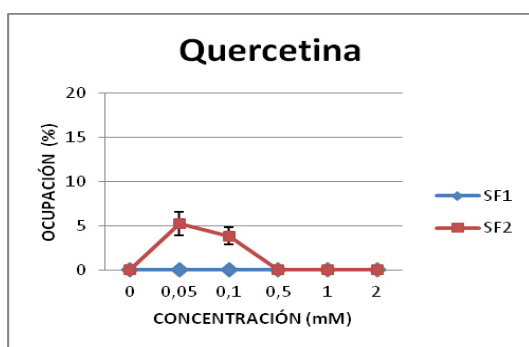
—●— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF1 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de eptifibatida a distintas concentraciones

—■— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF2 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de eptifibatida a distintas concentraciones.

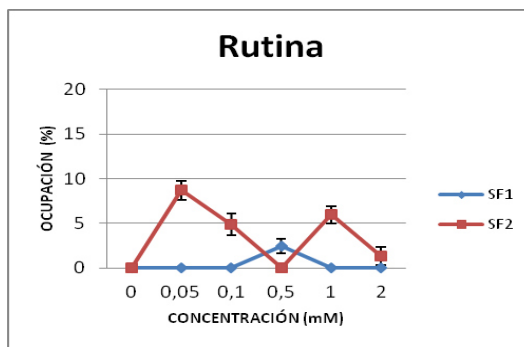
* $p < 0,05$ representa las diferencias significativas de cada concentración respecto de la situación basal.

Quercetina y rutina

Con quercetina la máxima ocupación se observa con la concentración 0.05 mM para el sitio de unión SF2. En el sitio SF1 no hay ocupación con ninguna de las concentraciones (Fig. 53A). En el caso de rutina, la máxima ocupación se observa a la concentración de 0.05 mM para SF2 y 0.5 mM para SF1 (Fig. 53B).



(A)



(B)

CONCENTRACIÓN	OCUPACIÓN	ERROR
0,05 mM	5,24	±1,3
0,1 mM	3,86	±0,98
0,5 Mm	0,00	0,00
1 mM	0,00	±1,4
2 mM	0,00	±0,99

CONCENTRACIÓN	OCUPACIÓN	ERROR
0,05 mM	8,69	±1,29
0,1 mM	4,85	±1,21
0,5 mM	2,42	±0,81
1 mM	5,97	±0,96
2 mM	1,35	±1,02

Figuras 53: Grado de ocupación de los sitios de fijación SF1 y SF2 del receptor GPIIb/IIIa por quercetina (A) y rutina (B).

- ◆— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF1 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de quercetina (A) y rutina (B) a distintas concentraciones.
- Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF2 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de quercetina (A) y rutina (B) a distintas concentraciones.

Diosmetina y diosmina

En el caso de diosmetina la máxima ocupación se observa en SF1 a la concentración 0.5 mM. En SF1 se observa un bajo porcentaje de ocupación con la concentración 0.1 mM. Con diosmina no hay ocupación en SF1 siendo la máxima ocupación en SF2 a la concentración de 2 mM (Fig. 54).

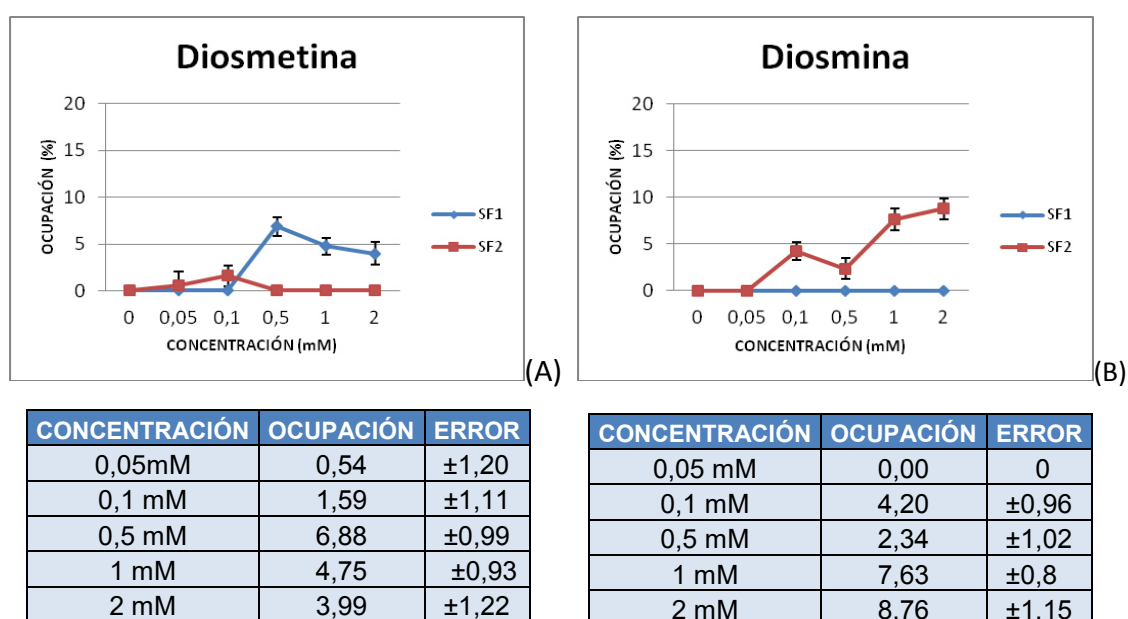


Figura 54: Grado de ocupación de los sitios de fijación SF1 y SF2 del receptor GPIIb/IIIa por diosmetina (A) y diosmina (B).

- ◆— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF1 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de diosmetina (A) y diosmina (B) a distintas concentraciones.
- Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF2 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de diosmetina (A) y diosmina (B) a distintas concentraciones.

Naringenina y naringina

En la figura 55A puede observarse que naringenina ocupa mayoritariamente SF2, correspondiendo el máximo porcentaje de ocupación a la concentración de 0,05mM. Se observa además un “efecto valle” a concentraciones intermedias. En el caso de SF1, se aprecia un pequeño porcentaje de ocupación a la concentración de 0,5mM.

El máximo porcentaje de ocupación de SF1 por naringina se alcanza a la concentración de 2mM, mientras que en el caso de SF2, la máxima ocupación se observa a la concentración de 0,5mM (Fig. 55B).

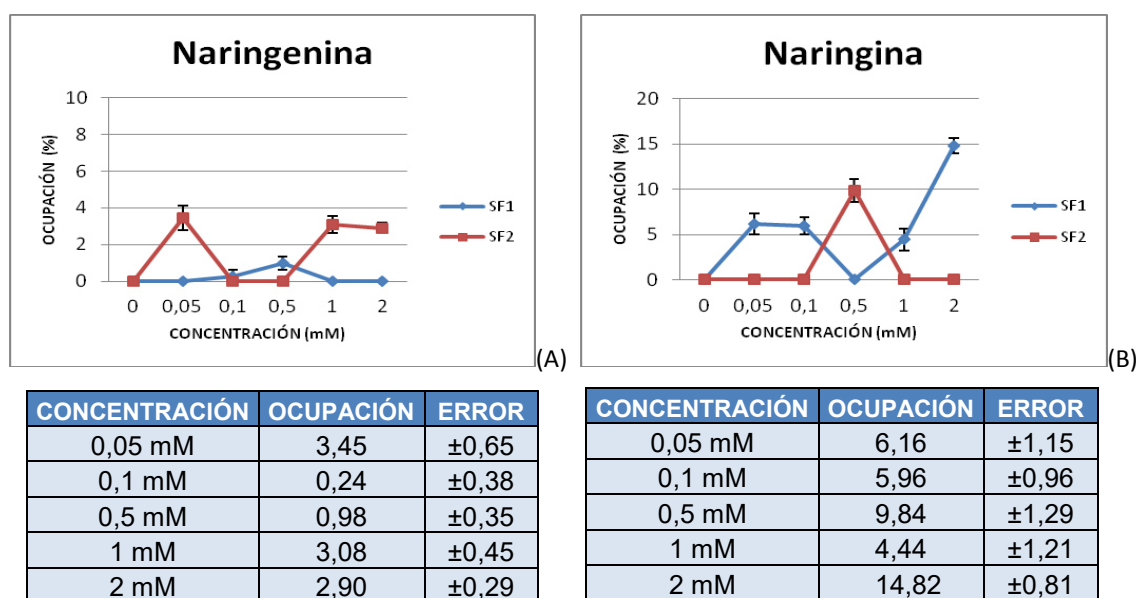


Figura 55: Grado de ocupación de los sitios de fijación SF1 y SF2 del receptor GPIIb/IIIa por naringenina (A) y naringina (B).

—◆— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF1 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de naringenina (A) y naringina (B) a distintas concentraciones.

—■— Representa la media y el error estándar del porcentaje de ocupación del SF2 del receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas por parte de naringenina (A) y naringina (B) a distintas concentraciones.

5.3. ESTUDIOS DE AGREGACIÓN PLAQUETARIA

En este apartado se describen los resultados obtenidos tras el estudio del comportamiento de las plaquetas, a través de sus cambios morfológicos empleando una técnica innovadora como es la citometría de flujo y otra habitualmente utilizada

como es la microscopía de fluorescencia. Para ello se emplea un potente agente proagregante, ionóforo de calcio 25mM disuelto en DMSO.

En primer lugar se observa el efecto de los flavonoides sobre la morfología y el comportamiento de las plaquetas. En segundo lugar se expresan los resultados obtenidos en presencia y ausencia de ionóforo de calcio. Por último, los cambios en la morfología de las plaquetas se confirman mediante microscopía de fluorescencia.

Tras la adquisición de las muestras en el citómetro de flujo se observa una distribución de las plaquetas en tres regiones diferentes, la región 1 donde se encuentran los agregados, la región 2 de plaquetas, y la región 3, en la cual se visualizan micropartículas derivadas de las plaquetas (PMPs) (Fig. 56).

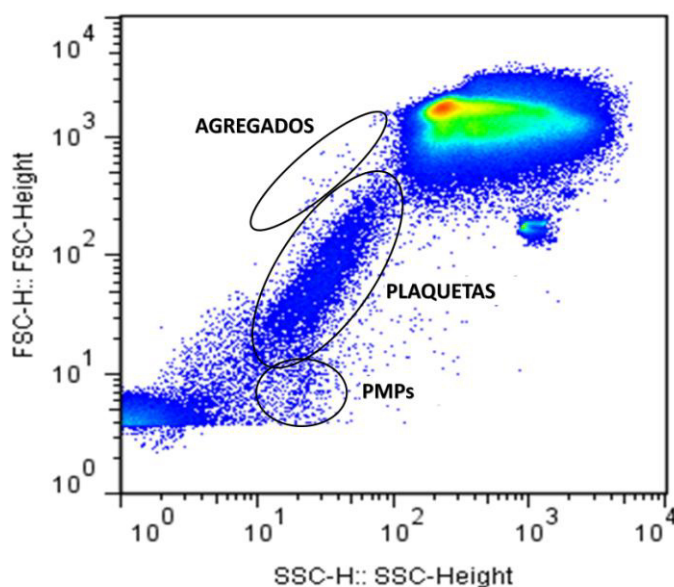


Figura 56: Distribución de las plaquetas en diferentes regiones mediante citometría de flujo.

5.3.1. ANÁLISIS MICROSCÓPICO DE LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES PLAQUETARIAS

Mediante una separación celular mediada por fluorescencia y utilizando un citómetro de flujo separador o *sorter*, se obtienen las diferentes subpoblaciones de plaquetas anteriormente descritas (Fig. 56). Las muestras se separan directamente en un porta convencional e inmediatamente se observan mediante un microscopio de

fluorescencia. En la figura 57 se representa la foto obtenida de la región 2 de plaquetas en reposo. En cambio en la figura 58 se observan partículas de mayor tamaño que corresponden a plaquetas agregadas de la región 1. La figura 59 muestra las PMPs de la región 3, de mucho menor tamaño que las plaquetas

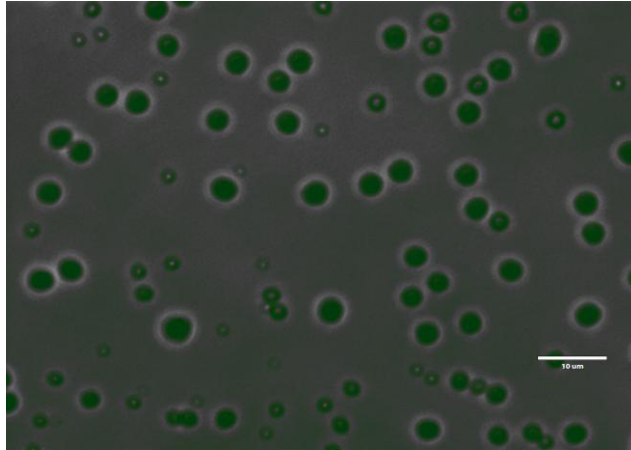


Figura 57: Foto obtenida por microscopía de fluorescencia donde se observan las plaquetas de la región 2 teñidas con fluoresceína.

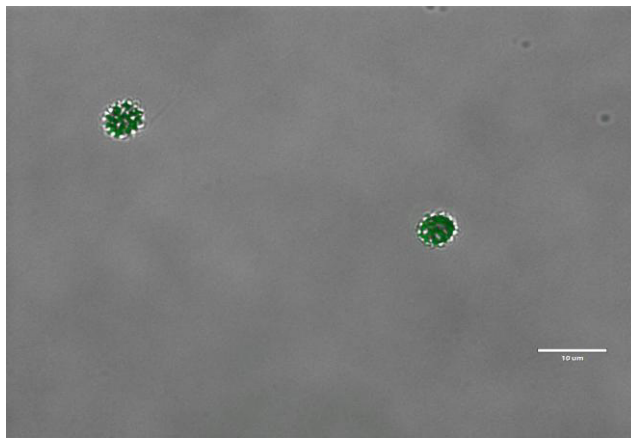


Figura 58: Foto obtenida por microscopía de fluorescencia donde se observan las plaquetas agregadas de la región 1 teñidas con fluoresceína.

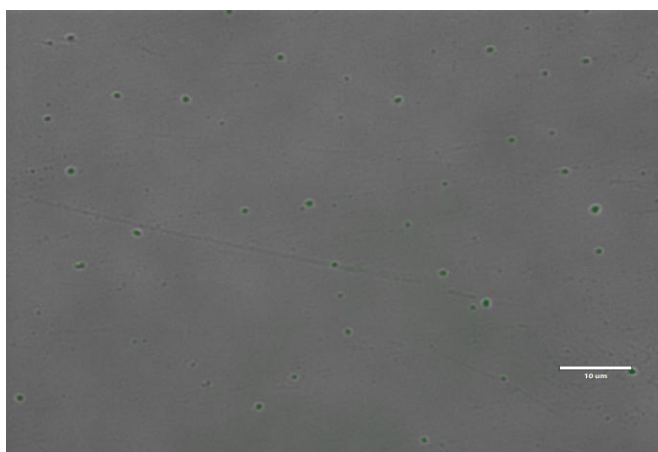


Figura 59: Foto obtenida por microscopía de fluorescencia donde se observan las PMPs de la región 3 teñidas con fluoresceína.

5.3.2. EFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS PLAQUETAS EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE UN AGENTE PROAGREGANTE

a) EN AUSENCIA DE UN AGENTE PROAGREGANTE.

Analizando las tres regiones del histograma descritas anteriormente se comprueba si la unión de estos productos al receptor GPIIb/IIIa produce cambios en la morfología de las plaquetas.

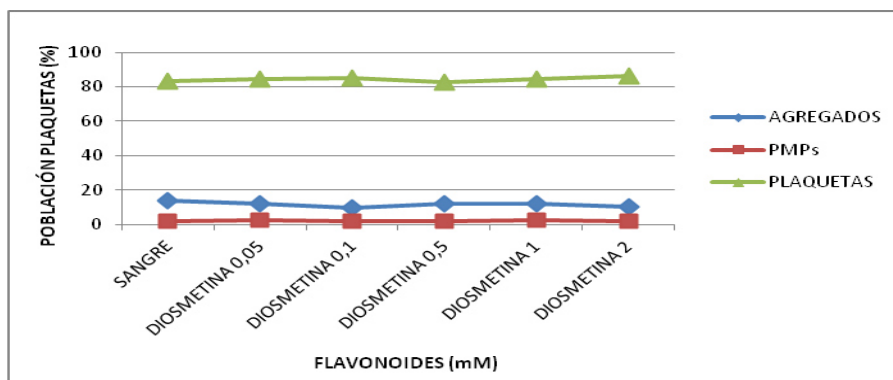


Figura 60: Comportamiento de las plaquetas en presencia de diosmetina

- ▲ Representa el porcentaje de plaquetas en presencia de diosmetina a las distintas concentraciones
- ◆ Representa el porcentaje de agregados en presencia de diosmetina a las distintas concentraciones.
- Representa el porcentaje de PMPs en presencia de diosmetina a las distintas concentraciones.

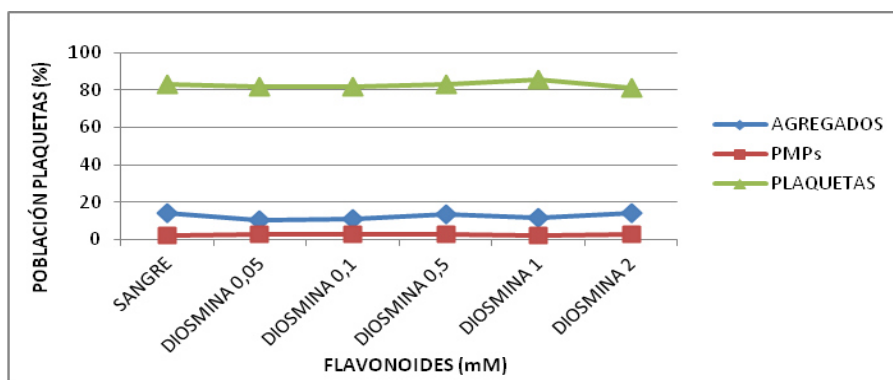


Figura 61: Comportamiento de las plaquetas en presencia de diosmina.

- ▲ Representa el porcentaje de plaquetas en presencia de diosmina a las distintas concentraciones
- ◆ Representa el porcentaje de agregados en presencia de diosmina a distintas concentraciones
- Representa el porcentaje de PMPs en presencia de diosmina a las distintas concentraciones

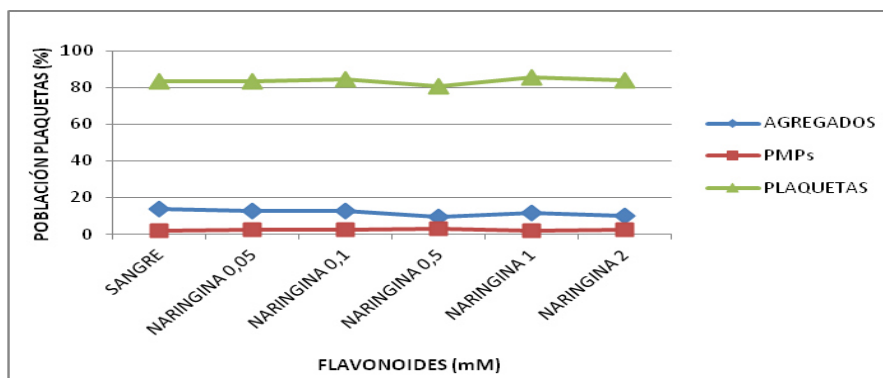


Figura 62: Comportamiento de las plaquetas en presencia de naringenina.

- ▲ Representa el porcentaje de plaquetas en presencia de naringenina a distintas concentraciones
- ◆ Representa el porcentaje de agregados en presencia de naringenina distintas concentraciones.
- Representa el porcentaje de PMPs en presencia de naringenina a las distintas concentraciones.

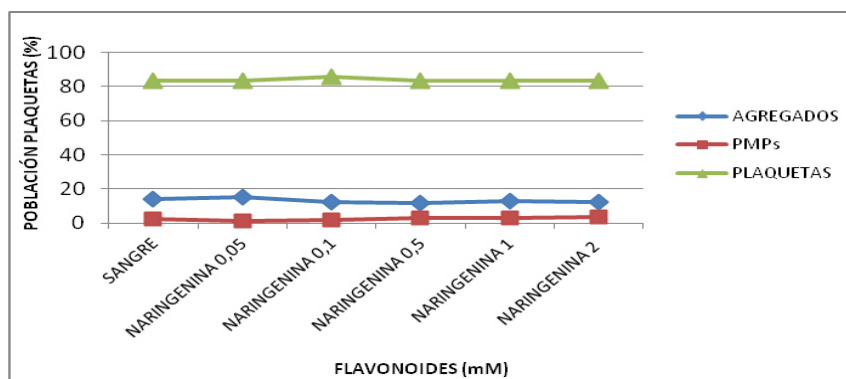


Figura 63: Comportamiento de las plaquetas en presencia de naringina.

- ▲ Representa el porcentaje de plaquetas en presencia de naringina a las distintas concentraciones

- ◆— Representa el porcentaje de agregados en presencia de naringina a distintas concentraciones.
- Representa el porcentaje de PMPs en presencia de naringina a distintas concentraciones.

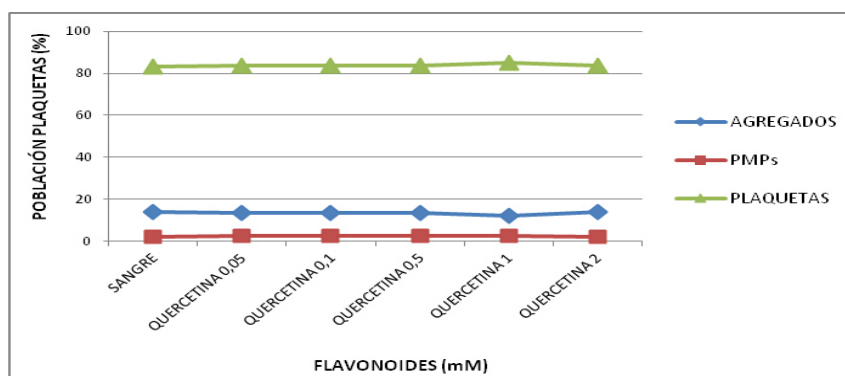


Figura 64: Comportamiento de las plaquetas en presencia de quercetina.

- ▲— Representa el porcentaje de plaquetas en presencia de quercetina a las distintas concentraciones
- ◆— Representa el porcentaje de agregados en presencia de naringina a las distintas concentraciones.
- Representa el porcentaje de PMPs en presencia de naringina a las distintas concentraciones.

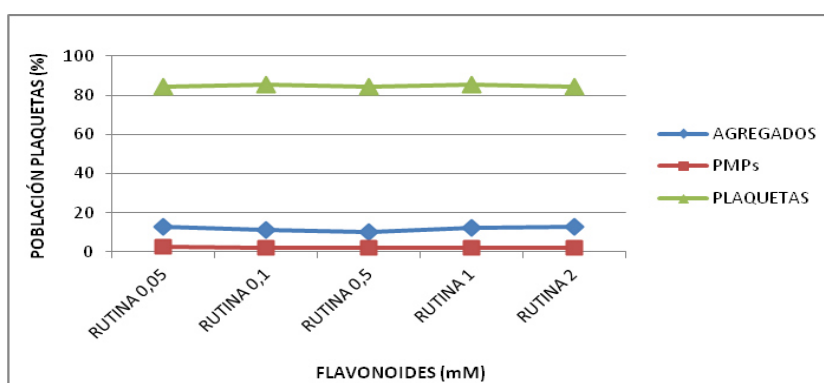


Figura 65: Comportamiento de las plaquetas en presencia de rutina

- ▲— Representa el porcentaje de plaquetas en presencia de rutina a las distintas concentraciones
- ◆— Representa el porcentaje de agregados en presencia de rutina a las distintas concentraciones.
- Representa el porcentaje de PMPs en presencia de rutina a las distintas concentraciones.

En las figuras anteriores se representa el porcentaje de plaquetas, agregados y PMPs en cada una de las regiones. Los flavonoides no provocan cambios en la distribución de las plaquetas en las distintas regiones estudiadas, lo cual demuestra que estos

fármacos no inducen activación plaquetaria por sí solos y por lo tanto no alteran la morfología de las plaquetas.

B) EN PRESENCIA DE UN AGENTE PROAGREGANTE

A continuación se estudia el efecto de los flavonoides sobre la morfología de las plaquetas en presencia de ionóforo de calcio (25mM) como agente proagregante y se selecciona la concentración de 2 mM para los compuestos ensayados.

El tubo control contiene sangre completa y DMSO, mientras que el resto de tubos, además de sangre completa, contienen los flavonoides a estudiar disueltos en DMSO. Toda la batería de tubos se realiza por duplicado para adicionar a una de las líneas el agente proagregante.

Región 1. Plaquetas agregadas

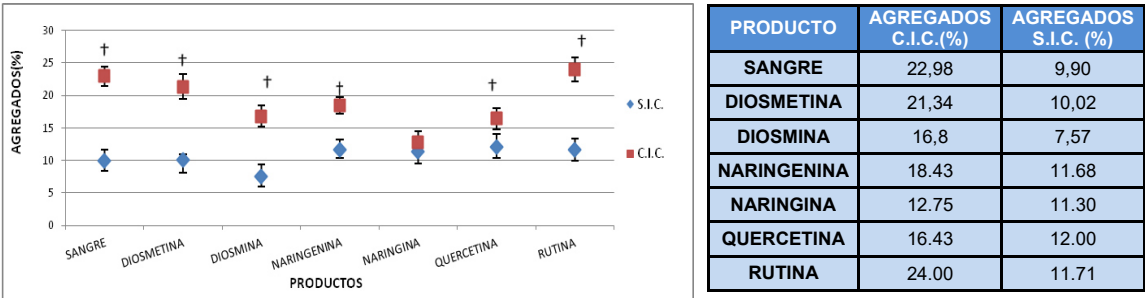


Figura 66: Efecto de los flavonoides a concentración 2 mM sobre la formación de agregados de plaquetas en presencia (C.I.C) y ausencia de ionóforo de calcio (S.I.C).

■ Representa la media y el error estándar del porcentaje de agregados de plaquetas en presencia de ionóforo de calcio al adicionar los flavonoides.

◆ Representa la media y el error estándar del porcentaje de agregados de plaquetas en ausencia de ionóforo de calcio al adicionar los flavonoides.

† $p < 0,05$ representa las diferencias significativas entre el porcentaje de agregados de plaquetas existentes con cada producto en presencia de ionóforo de calcio en comparación con la ausencia del mismo.

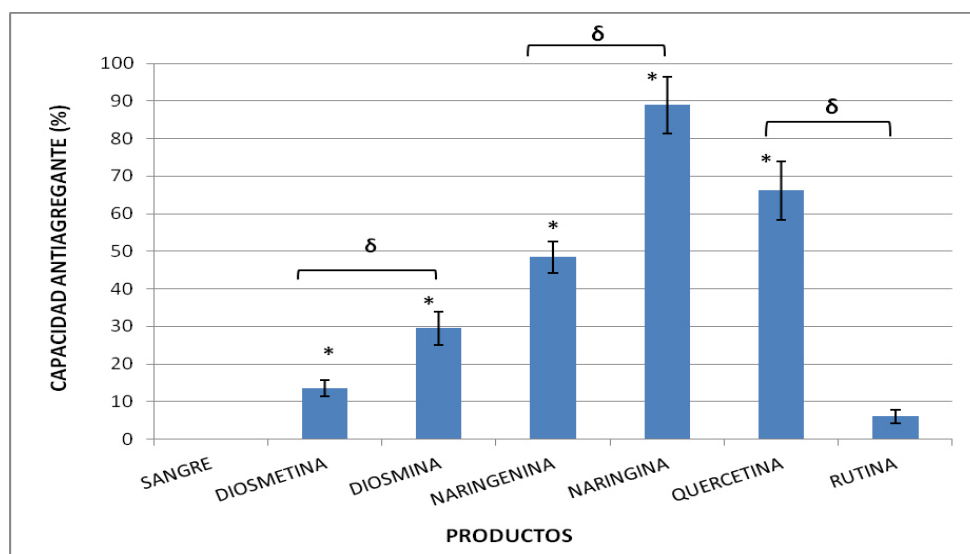


Figura 67: Capacidad antiagregante plaquetaria de los flavonoides a concentración 2mM en la región de los agregados. * $p<0,05$ representa las diferencias significativas entre la capacidad antiagregante de cada producto con la situación basal. δ $p<0,05$ representa las diferencias significativas entre genina y heterósido en los distintos flavonoides.

Se observa una disminución de la agregación plaquetaria inducida por ionóforo de calcio en presencia de diosmetina, diosmina, naringenina, naringina y quercetina. En cambio con rutina la concentración de agregados de plaquetas no disminuye respecto al control (Fig. 66 y 67).

Región 2. Plaquetas

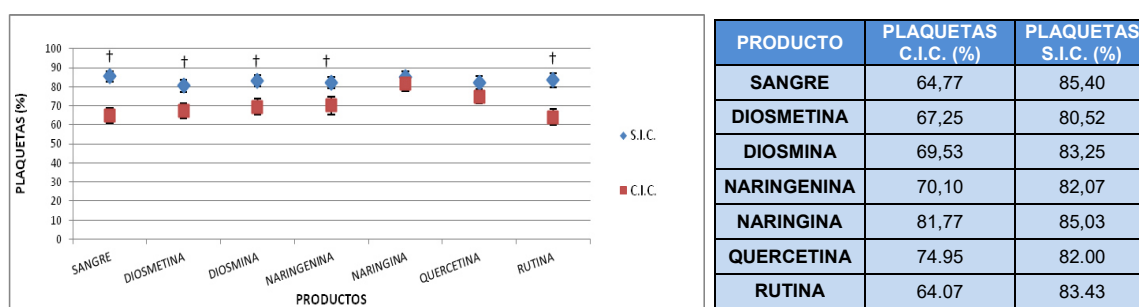


Figura 68: Efecto de los flavonoides a concentración 2 mM sobre las plaquetas en presencia (C.I.C.) y ausencia de ionóforo de calcio (S.I.C.)

■ Representa la media y el error estándar del porcentaje de plaquetas en presencia de ionóforo de calcio al adicionar los productos objeto de estudio.

◆ Representa la media y el error estándar del porcentaje de plaquetas en ausencia de ionóforo de calcio al adicionar los productos objeto de estudio.

† $p<0,05$ representa las diferencias significativas entre el porcentaje de plaquetas existentes con cada producto en presencia de ionóforo de calcio y en ausencia del mismo.

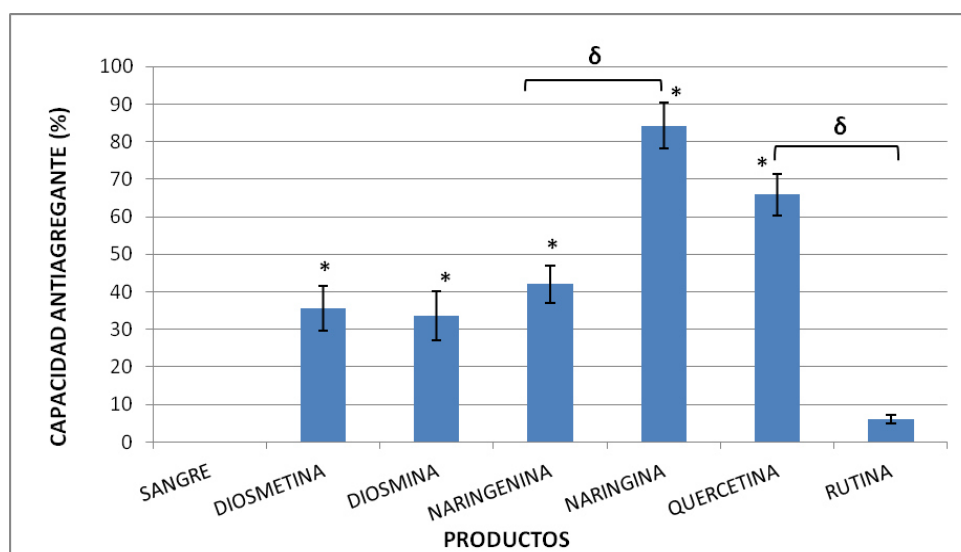


Figura 69: Capacidad antiagregante plaquetaria de los flavonoides a concentración 2mM en la región de las plaquetas. * $p<0,05$ representa las diferencias significativas entre la capacidad antiagregante de cada producto con la situación basal. δ $p<0,05$ representa las diferencias significativas entre genina y heterósido en los distintos flavonoides.

En presencia de ionóforo de calcio el porcentaje de plaquetas en la nube central disminuye como consecuencia de la agregación y formación de PMPs. En presencia de todos los flavonoides estudiados esta disminución es menor (Fig. 68 y 69).

Región 3. Micropartículas derivadas de plaquetas (PMPs)

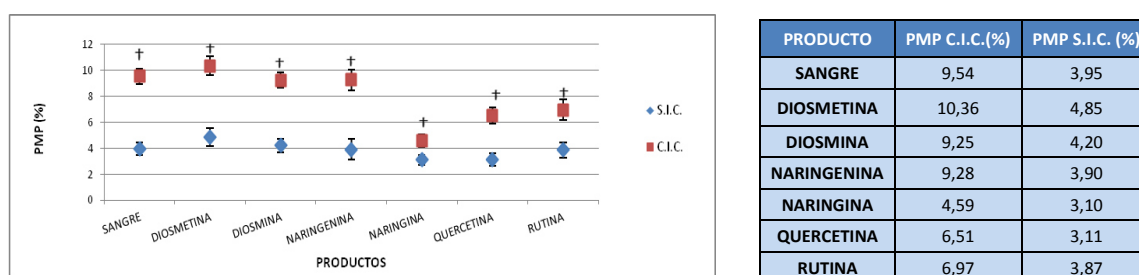


Figura 70: Efecto de los flavonoides a concentración 2 mM sobre la formación de PMPs en presencia (C.I.C.) y ausencia ionóforo de calcio (S.I.C.)

■ Representa la media y el error estándar del porcentaje de PMPs en presencia de ionóforo de calcio al adicionar los productos objeto de estudio.

◆ Representa la media y el error estándar del porcentaje de PMPs en ausencia de ionóforo de calcio al adicionar los productos objeto de estudio.

† $p < 0,05$ representa las diferencias significativas entre el porcentaje de PMPs existentes con cada producto en presencia de ionóforo de calcio y en ausencia del mismo.

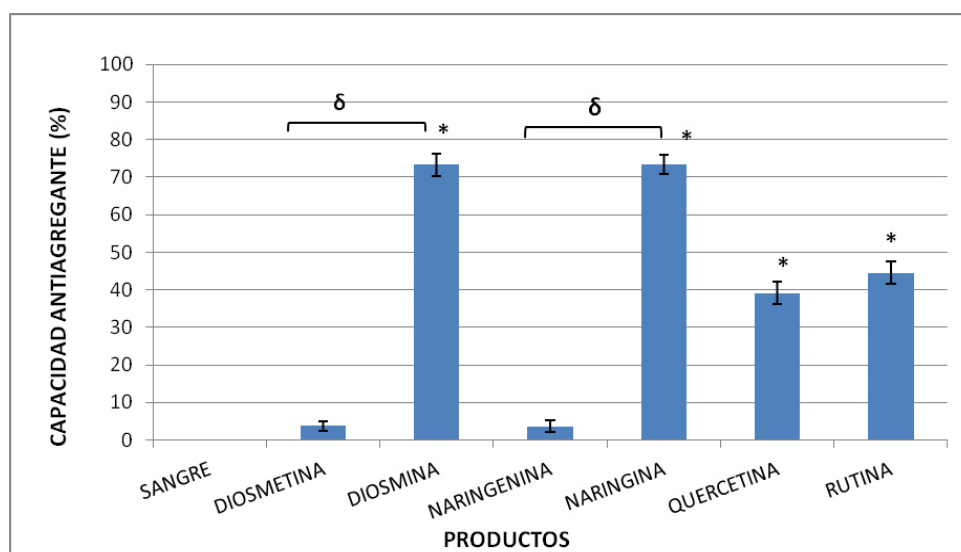


Figura 71: Capacidad antiagregante plaquetaria de los flavonoides a concentración 2mM en la región de las micropartículas derivadas de plaquetas. * $p < 0,05$ representa las diferencias significativas entre la capacidad antiagregante de cada producto con la situación basal. δ $p < 0,05$ representa las diferencias significativas entre genina y heterósido en los distintos flavonoides.

Todos los fármacos estudiados presentan capacidad antiagregante. Los flavonoides quercetina, naringina, y diosmina poseen el mayor efecto observado con porcentajes de inhibición de la agregación plaquetaria en presencia de ionóforo de calcio del 66%, del 89%, y del 73% respectivamente. En el caso de diosmina/diosmetina y naringina/naringenina los heterósidos presentan mayor actividad antiagregante que la genina, mientras que los datos obtenidos con quercetina/rutina indican que la genina posee mayor actividad excepto en la región de PMPs, donde los resultados de ambas son muy similares.

5.4. EFECTO DE LOS FLAVONOIDES SOBRE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PROINFLAMATORIAS

El inicio de cualquier respuesta inmunológica requiere la síntesis de una gran variedad de proteínas efectoras. Se conocen muchos de los mecanismos intracelulares implicados en la síntesis de estos mediadores. Está ampliamente descrito que, en un

proceso inflamatorio se encuentra incrementada la síntesis de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β .

Con el fin de poner de manifiesto la actividad moduladora de los flavonoides en este proceso se lleva a cabo un estudio *in vitro* sobre la producción de las citoquinas anteriormente mencionadas.

Para ello se emplean kits de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) específicos para cada citoquina. Para inducir la producción de las citoquinas se emplea LPS.

5.4.1. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE IL-1 β

- Curva tiempo-respuesta

Para conocer el tiempo de incubación de la sangre con el LPS al que se obtiene la mayor producción de IL-1 β , se realiza una curva tiempo-respuesta (Fig. 72).

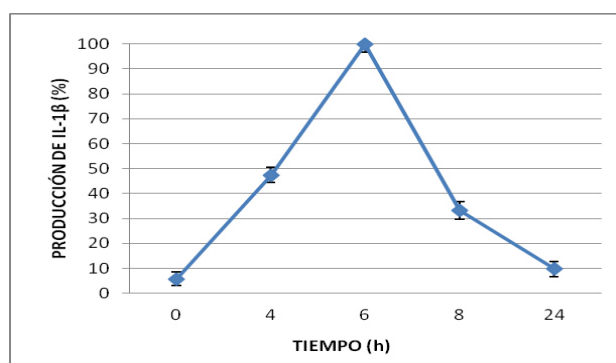
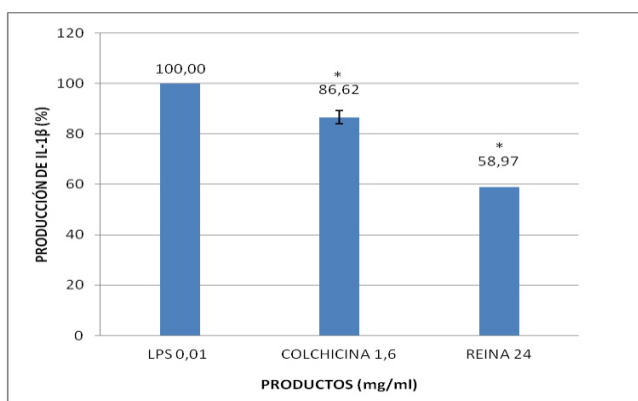


Figura 72: Producción de IL-1 β a distintos tiempos de incubación

Los resultados se expresan en tantos porcentuales, refiriendo el 100% al máximo de producción de IL-1 β que se produce en el tubo control que contiene sangre completa y LPS. A las 6h se obtiene la mayor producción de IL-1 β siendo éste, por tanto, el tiempo de incubación empleado.

- Controles positivos

Como controles positivos se ensayan la colchicina y la reína. Los resultados demuestran que la colchicina inhibe un 13% la producción de IL-1 β estimulada por LPS, mientras que la reína la inhibe un 40%. Ante los datos obtenidos, se decide emplear la reína como control positivo para los estudios de inhibición de IL-1 β .



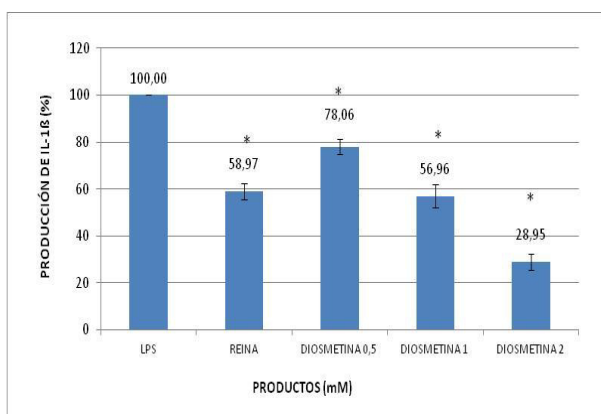
CONCENTRACIÓN (mg/ml))	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN IL-1β (%)
LPS 0,01	0
COLCHICINA 1,6	13,38
REINA 24	41,03

Figura 73: Controles del experimento * $p<0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo.

- Diosmetina y diosmina

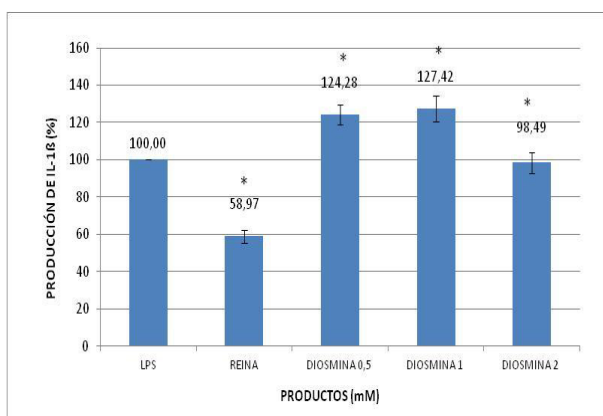
Diosmetina inhibe la producción de IL-1 β de forma concentración-dependiente. El máximo porcentaje de inhibición se observa con la concentración 2mM y es del 71.05%.

Diosmina presenta un efecto sinérgico sobre la producción de IL-1 β a las concentraciones más bajas.



CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN IL-1β (%)
LPS	0
DIOSMETINA 0,5	21,94
DIOSMETINA 1	43,04
DIOSMETINA 2	71,05

Figura 74: Efecto de diosmetina sobre la producción de IL-1 β inducida por LPS * $p<0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo



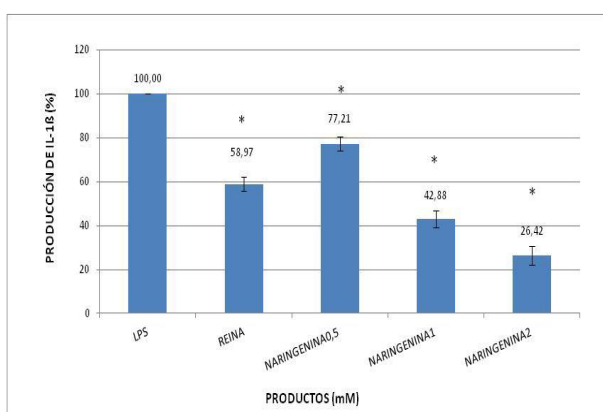
CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN IL-1β (%)
LPS	0
DIOSMINA 0,5	0,00
DIOSMINA 1	0,00
DIOSMINA 2	1,51

Figura 75: Efecto de diosmina sobre la producción de IL-1 β inducida por LPS * $p < 0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo.

- Naringenina y naringina

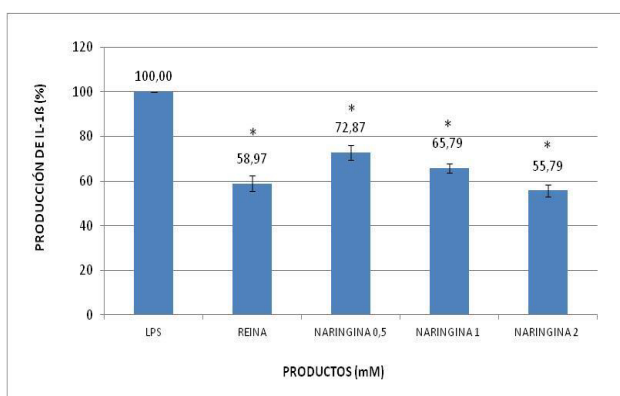
Naringenina inhibe la producción de IL-1 β un 73,58 % a la dosis de 2mM.

Naringina posee menor capacidad de inhibir la producción de IL-1 β que la genina, presentando un porcentaje de inhibición del 44,21% a la mayor dosis.



CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN IL-1β (%)
LPS	0
NARINGENINA 0,5	22,79
NARINGENINA 1	57,12
NARINGENINA 2	73,58

Figura 76: Efecto de naringenina sobre la producción de IL-1 β inducida por LPS * $p < 0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo



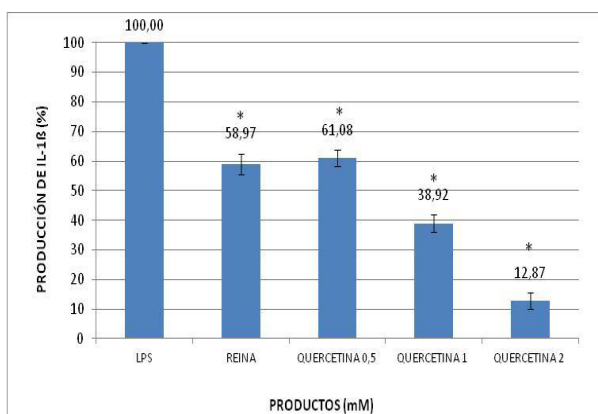
CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN IL-1β (%)
LPS	0
NARINGINA 0,5	27,13
NARINGINA 1	34,21
NARINGINA 2	44,21

Figura 77: Efecto de naringina sobre la producción de IL-1β inducida por LPS * $p<0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo

- Quercetina y rutina

Quercetina tiene un efecto inhibidor de la producción de IL-1β que aumenta con la concentración. La concentración 2mM produce una inhibición del 87.14% (Fig.78)

Los resultados obtenidos con rutina son diferentes a lo que cabía esperar puesto que en presencia de LPS, parece ejercer un efecto sinérgico sobre la producción de IL-1β, aumentando ésta hasta un 136,29% (Fig. 79).



CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN IL-1β (%)
LPS	0
QUERCETINA 0,5	38,92
QUERCETINA 1	61,08
QUERCETINA 2	87,14

Figura 78: Efecto de quercetina sobre la producción de IL-1β inducida por LPS * $p<0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo

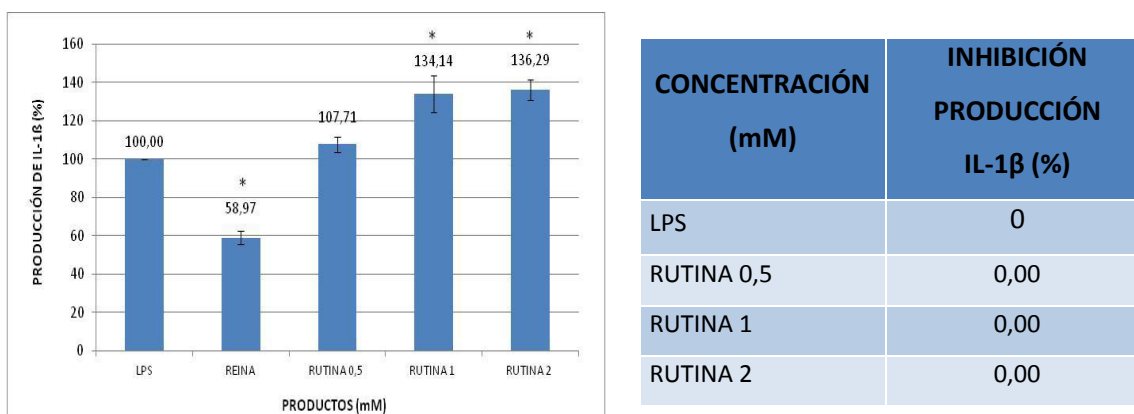


Figura 79: Efecto de rutina sobre la producción de IL-1 β inducida por LPS * $p < 0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo

5.4.2. ESTUDIOS DE INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TNF- α

Curva tiempo-respuesta

Con el fin de conocer el tiempo de incubación de la sangre con el LPS al que se obtiene la mayor producción de TNF- α , se realiza una curva tiempo-respuesta (Fig.80)

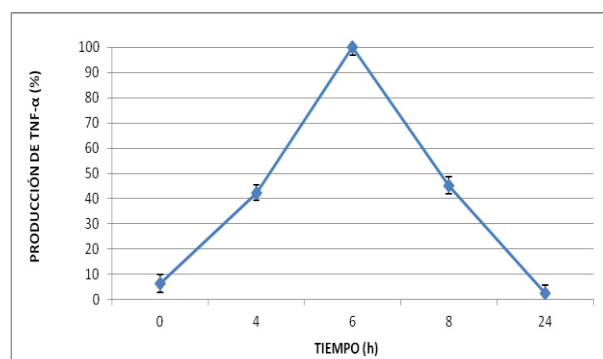


Figura 80: Producción de TNF- α a distintos tiempos de incubación

Los resultados se expresan en tantos porcentuales, refiriendo el 100% al máximo de producción de TNF- α que se produce en el tubo control que contiene sangre completa y LPS. A las 6h se obtiene la mayor producción de TNF- α siendo éste, por tanto, el tiempo de incubación empleado

Diosmetina y diosmina

Diosmetina inhibe la producción de TNF-α un 84.11% a la concentración 2 mM. El heterósido diosmina a la concentración 2mM presenta un efecto inhibidor del 15.60%.

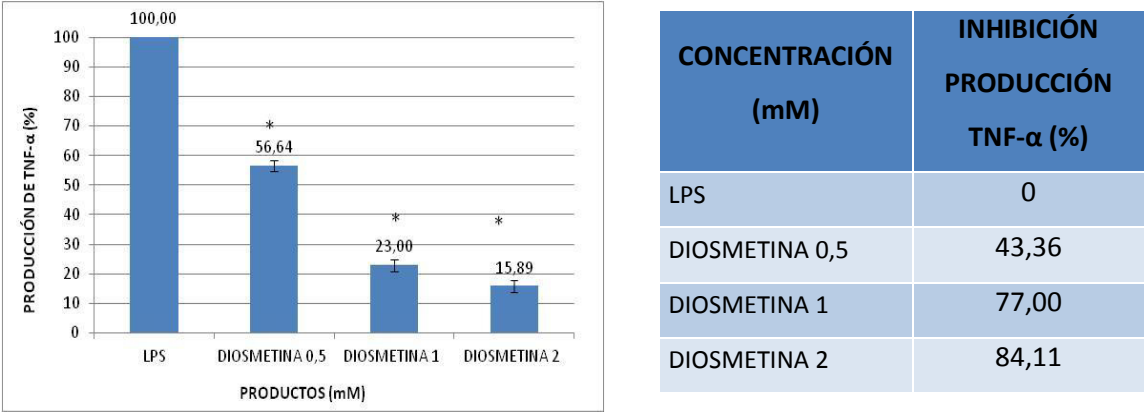


Figura 81: Efecto de diosmetina sobre la producción de TNF-α inducida por LPS * $p<0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo

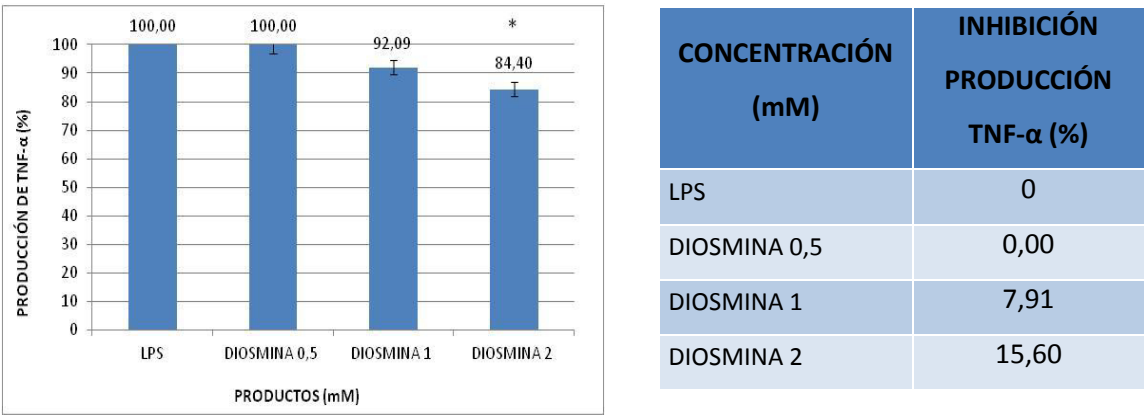
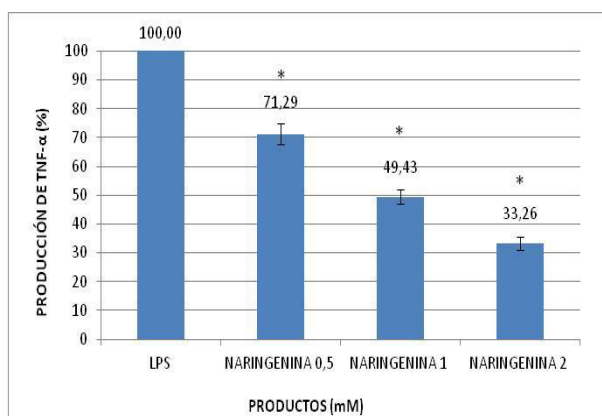


Figura 82: Efecto de diosmina sobre la producción de TNF-α inducida por LPS * $p<0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo

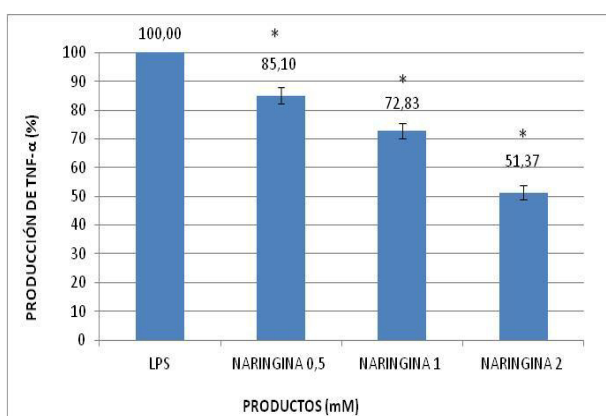
Naringenina y naringina

Naringenina 2mM inhibe la producción de TNF-α un 66.74% y naringina 2 mM un 48.63%.



CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN TNF-α (%)
LPS	0
NARINGENINA 0,5	28,71
NARINGENINA 1	50,57
NARINGENINA 2	66,74

Figura 83: Efecto de naringenina sobre la producción de TNF-α inducida por LPS * $p<0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo



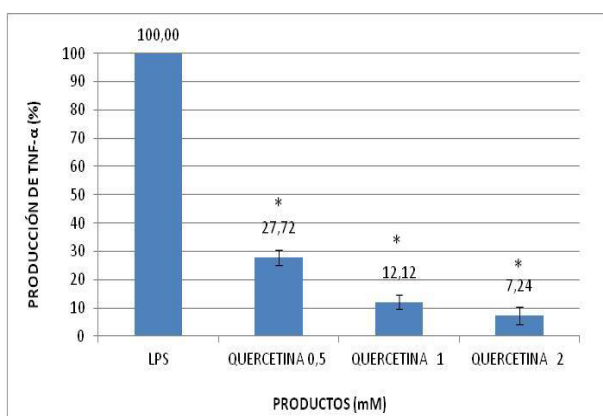
CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN TNF-α (%)
LPS	0
NARINGINA 0,5	14,90
NARINGINA 1	27,17
NARINGINA 2	48,63

Figura 84: Efecto de naringina sobre la producción de TNF-α inducida por LPS * $p<0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo

Quercetina y rutina

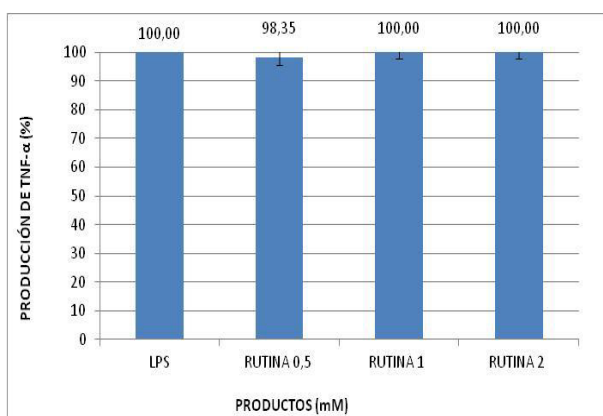
Quercetina presenta un potente efecto inhibidor de la producción de TNF con un porcentaje de inhibición del 92.76 % a la concentración 2mM.

Rutina carece de efecto inhibidor de la producción de esta citoquina.



CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN TNF-α (%)
LPS	0
QUERCETINA 0,5	72,28
QUERCETINA 1	87,88
QUERCETINA 2	92,76

Figura 85: Efecto de quercetina sobre la producción de TNF-α inducida por LPS * $p < 0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo



CONCENTRACIÓN (mM)	INHIBICIÓN PRODUCCIÓN TNF-α (%)
LPS	0
RUTINA 0,5	1,65
RUTINA 1	0,00
RUTINA 2	0,00

Figura 86: Efecto de rutina sobre la producción de TNF-α inducida por LPS * $p < 0,05$ representa las diferencias significativas de la media y el error estándar de cada control positivo con el control negativo

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA MODULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS POR LOS PRODUCTOS ESTUDIADOS

A) IL-1β:

- GENINAS

En la figura 87 los resultados muestran una disminución de la producción de IL-1β por las geninas estudiadas. Se observa que este efecto aumenta con la concentración, obteniéndose la menor producción de citoquina (87%) con quercetina 2 mM.

Naringenina y Diosmetina inhiben también en un elevado porcentaje la producción de esta citoquina (71% y 75 % respectivamente).

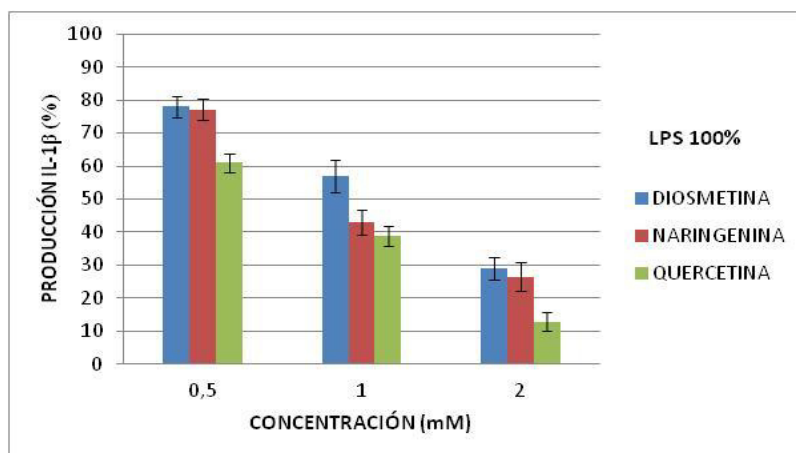


Figura 87: Producción de IL-1 β en presencia de las geninas estudiadas a distintas concentraciones.

- HETERÓSIDOS

El único heterósido con capacidad para inhibir la producción de IL-1 β es naringina, con una inhibición que aumenta con la concentración (44%). En el caso de rutina y diosmina, sorprendentemente se observa un aumento de la producción de IL-1 β en presencia de LPS (Fig. 88).

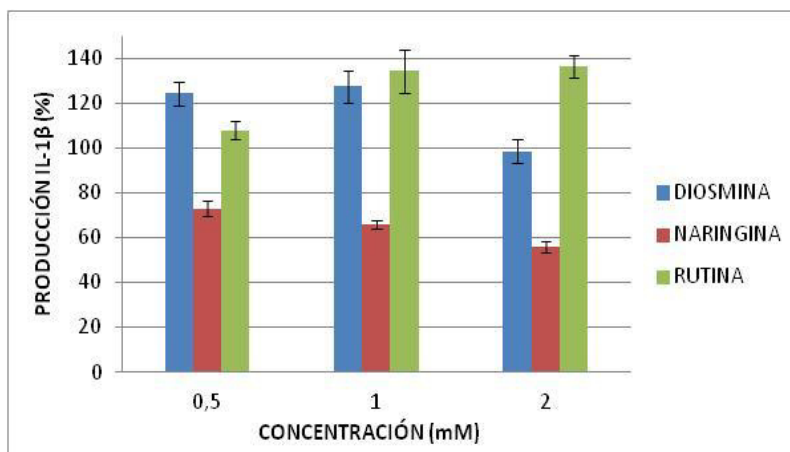


Figura 88: Producción de IL-1 β en presencia de los heterósidos estudiados a distintas concentraciones.

- HETEROSIDOS vs GENINAS

Tanto heterósidos como geninas aumentan su efecto sobre la producción de IL-1 β con la concentración, siendo la dosis más activa la de 2 mM. Todas las geninas han

demostrado tener capacidad para inhibir la producción de IL-1 β a esta concentración. En cambio, los heterósidos no muestran un efecto inhibitor tan marcado, ya que sólo se produce con naringina. Rutina y diosmina producen un aumento de la producción de IL-1 β en presencia de LPS (Fig. 89).

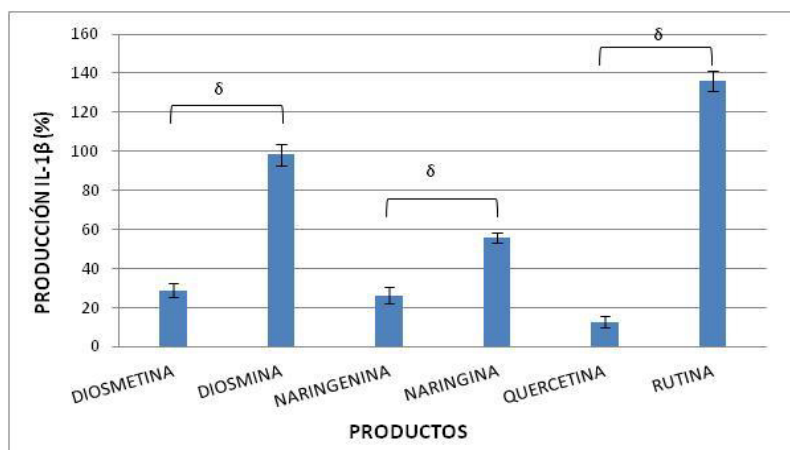


Figura 89: Producción de IL-1 β en presencia de los heterósidos y geninas estudiados a la concentración 2Mm. δ $p < 0,05$ representa las diferencias significativas entre genina y heterósido en los distintos flavonoides.

b) TNF- α

- GENINAS

Todas las geninas estudiadas presentan un efecto sobre la producción de TNF- α que aumenta con la concentración. Quercetina es la genina más activa, con una gran inhibición de la producción de esta citoquina a la concentración de 2 mM (93%). Le sigue diosmetina (84%) y por último naringenina (67%) (Fig. 90).

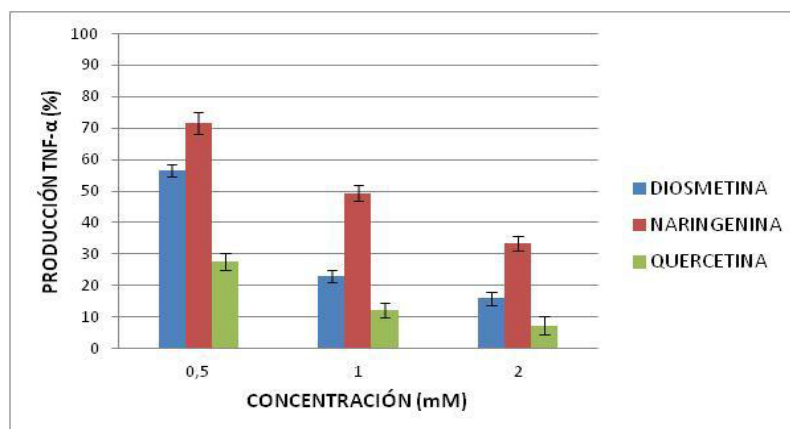


Figura 90: Producción de TNF- α en presencia de las geninas estudiadas.

- HETERÓSIDOS

No todos los heterósidos presentan capacidad para inhibir la producción de TNF- α . Rutina no tiene efecto sobre la producción de esta citoquina. Diosmina 2 mM inhibe la producción un 16% y el más activo es naringina (49%) (Fig. 91).

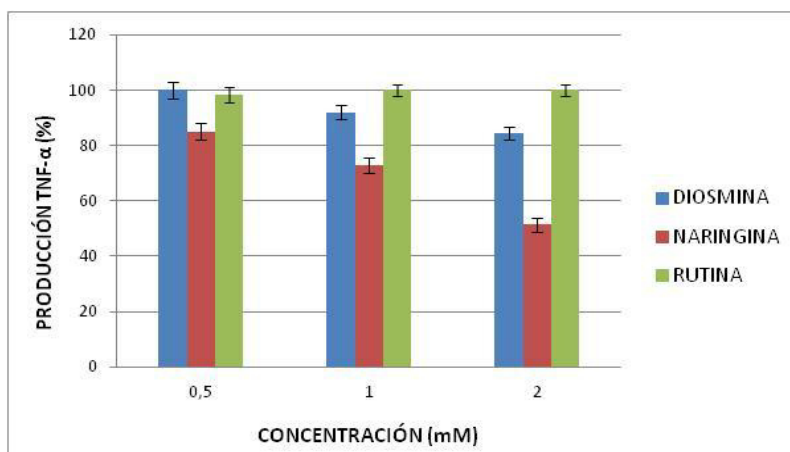


Figura 91: Producción de TNF- α en presencia de los heterósidos estudiados.

- HETERÓSIDOS vs GENINAS

Las geninas presentan mayor capacidad para inhibir la producción de TNF- α . Quercetina es la más activa; sin embargo, el heterósido rutina, carece de actividad. Diosmetina presenta mayor capacidad de inhibición de la producción de esta citoquina que su heterósido diosmina. Naringenina y naringina tienen actividad similar con una inhibición de 67% y 49% respectivamente (Fig. 92).

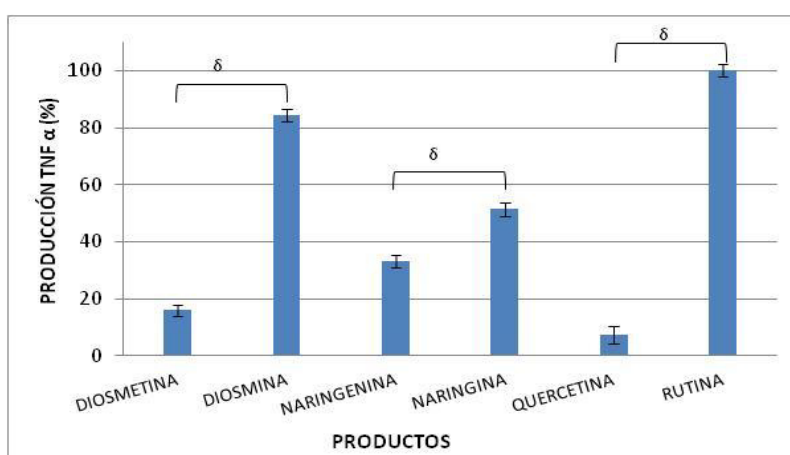


Figura 92: Producción de TNF- α en presencia de los heterósidos y geninas estudiados a la concentración 2Mm. δ $p < 0,05$ representa las diferencias significativas entre genina y heterósido en los distintos flavonoides.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA CAPACIDAD ANTIAGREGANTE Y LA MODULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS POR LOS PRODUCTOS ESTUDIADOS

De todos los compuestos estudiados, la rutina es el único flavonoide que no tiene capacidad inmunomoduladora sobre las células productoras de IL-1 β y TNF- α así como incapacidad para inhibir la agregación plaquetaria.

Quercetina es el flavonoide que presenta una mayor capacidad de inhibir la producción de IL-1 β y TNF- α (87 y 93%, respectivamente) y posee también una relevante capacidad antiagregante (66%). Naringenina, aunque tiene menor capacidad de inhibición de la producción de IL-1 β y TNF- α , sí presenta una adecuada capacidad antiagregante. En el caso de diosmetina se observa mejor capacidad inmunomoduladora que con naringenina; sin embargo es el flavonoide con menor capacidad antiagregante, descartando la rutina, flavonoide que ha demostrado con muy poca actividad en ambos ensayos. De todos los flavonoides estudiados naringina es el compuesto con mayor actividad antiagregante (93%); sin embargo la inhibición de la producción de citoquinas por este heterósido es baja (48%) comparada con la de quercetina y diosmetina. La diosmina tiene muy poca actividad inmunomoduladora (16%) y posee una capacidad antiagregante plaquetaria del 30% inferior a la de naringina y quercetina (Fig. 93).

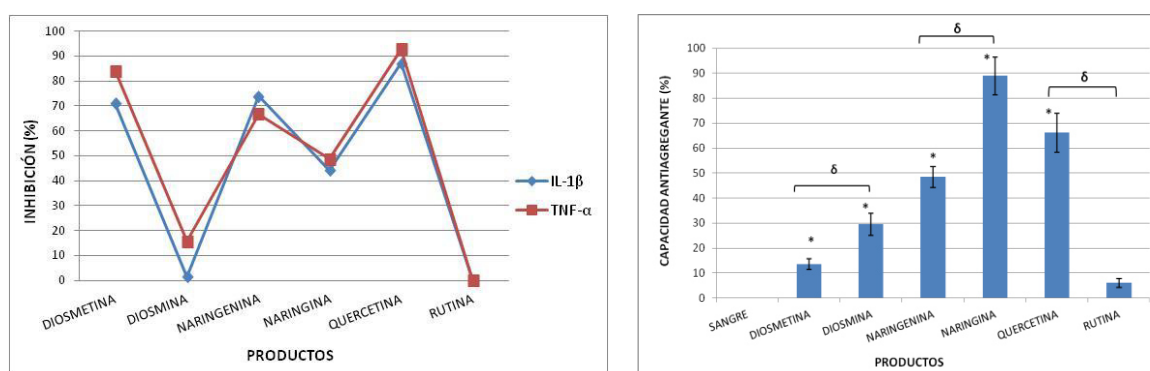


Figura 93: Efecto de los compuestos a concentración 2mM sobre la producción de citoquinas (izquierda) y sobre la agregación plaquetaria (derecha). * $p<0,05$ representa las diferencias significativas entre la capacidad antiagregante de cada producto con la situación basal. δ $p<0,05$ representa las diferencias significativas entre geninas y heterósidos.

5. DISCUSIÓN

- ESTUDIOS DE DISOLUCIÓN PARA CITOMETRÍA DE FLUJO

La disolución de los flavonoides en mezclas hidroalcohólicas plantea grandes dificultades en el análisis de plaquetas mediante la técnica de citometría de flujo. Los resultados que se han obtenido al emplear etanol y metanol como disolventes han demostrado que estos alcoholes interfieren en la ocupación del receptor GPIIb/IIIa, obteniéndose valores de porcentaje de ocupación diferentes con cada disolvente empleado a pesar de mantener constante la concentración del control positivo. Por otra parte, las mezclas hidroalcohólicas no permiten disolver alguno de estos productos a las concentraciones requeridas en los ensayos.

Estudios previos a nuestro modelo experimental demuestran que el DMSO puede afectar a la morfología de las plaquetas a determinadas concentraciones, lo cual podría traducirse en una disminución de la respuesta a sus propios agonistas (Guillaumin J, 2010), con problemas de toxicidad y daño plaquetario (Carvalho KM, 2010). En este trabajo se ha conseguido un modelo experimental que emplea la máxima concentración de DMSO capaz de no interferir en la estructura ni en la funcionalidad de las plaquetas, al tiempo que permite la disolución de los flavonoides a las concentraciones deseadas. Johnson *et al.* (2011) después de experimentar problemas similares, consiguen resolverlos utilizando DMSO a concentraciones semejantes a las empleadas en nuestro trabajo.

- ESTUDIOS DE OCUPACIÓN DEL RECEPTOR GPIIb/IIIa

El estudio de ocupación del receptor GPIIb/IIIa por los polifenoles se lleva a cabo mediante citometría de flujo, apoyado con los trabajos de Quinn M (1999).

Como ya se ha descrito anteriormente en esta memoria, se han empleado dos anticuerpos monoclonales (Mab1 y Mab2). Mab1 es un anticuerpo monoclonal antihumano de origen murino, clon del LYP18, para el complejo GPIIb/IIIa; mientras

que Mab2 es un clon del 4F8, un anticuerpo monoclonal antihumano de origen murino de la subunidad β -III.

Cada uno de estos anticuerpos se une de manera diferente a la glicoproteína GPIIb/IIIa. Mab1 se une a todo el complejo glicoproteico, pero no interfiere en el lugar de unión de Mab2, permitiendo su unión incluso al mismo tiempo. Mab2 se une específicamente a una zona de la subunidad IIIa, siendo compatible su actuación con la de Mab1.

- **CONTROLES POSITIVOS:**

Abciximab (Reopro[®]) procede de un anticuerpo monoclonal murino dirigido contra el receptor GPIIb/IIIa que inhibe la unión del fibrinógeno a las plaquetas, por lo que se comporta como antiagregante plaquetario. El fragmento Fc de uno de esos anticuerpos, el 7E3, fue separado para prevenir la inmunogenicidad y los fragmentos Fab se unieron a las regiones constantes de las inmunoglobulinas IgG humanas, formando un único compuesto.

Eptifibatida, un fármaco que inhibe de forma reversible la agregación plaquetaria, es un heptapéptido cíclico formado por 6 aminoácidos y un residuo de mercaptopropionil cisteína. Pertenece a la clase de agentes miméticos KGD (lisina-glicina-aspartato), que impide la agregación plaquetaria al inhibir reversiblemente la unión de fibrinógeno y del factor de von Willebrand con el receptor glicoproteico plaquetario IIb/IIIa. La inhibición plaquetaria es dependiente de la dosis y de la concentración de este agente (Proimos G, 2001).

Eptifibatida se une específicamente a una zona de la subunidad IIIa, al igual que el anticuerpo monoclonal del kit, Mab2. Compiten por el mismo sitio de unión; sin embargo abciximab se une a todo el complejo del receptor compitiendo con Mab1, aunque no por ello impide la unión de eptifibatida o en su defecto, de Mab2 (Quinn M, 1999).

Los resultados obtenidos en nuestros experimentos con los controles positivos confirman la validez de los mismos, ya que, como cabe esperar, en todos los casos se obtienen altos porcentajes de ocupación.

Con los flavonoides objeto de estudio, los datos obtenidos muestran un moderado porcentaje de unión al receptor plaquetario GPIIb/IIIa. No se ha encontrado que exista ninguna preferencia de ocupación por ninguno de los epítomos ya que la unión de los productos al receptor es poco selectiva. Sin embargo, sí existen diferencias de actuación entre los heterósidos y las geninas. Los mayores grados de ocupación se observan con rutina, diosmina y naringina; siendo este último flavonoide el que presenta el mayor porcentaje de ocupación, cuatro veces mayor que el de naringenina. Esto pudiera deberse a la presencia del azúcar en el heterósido. No se ha observado ninguna relación entre el grado de ocupación y la concentración. En el caso de quercetina la máxima ocupación se obtiene con la menor concentración 0.5 mM; sin embargo naringina presenta el mayor porcentaje de ocupación a la concentración de 2 mM.

Tras observar que los flavonoides estudiados poseen capacidad para unirse al receptor GPIIb/IIIa se planteó la hipótesis de un dualismo competitivo como mecanismo del efecto antiagregante de estos compuestos. Según esta hipótesis los flavonoides ejercerían su efecto antiagregante únicamente en presencia de un agonista, compitiendo con éste por el sitio de unión al receptor y sin afectar al estado de las plaquetas en reposo.

Éste fue el planteamiento que motivó el estudio del comportamiento de las plaquetas, así como de sus cambios morfológicos en presencia de los flavonoides y mediante la técnica de citometría de flujo.

- EFECTOS SOBRE LA MORFOLOGÍA DE LAS PLAQUETAS

Tras la extracción de las muestras de sangre se emplean tubos con citrato sódico (3.8% wt/vol), anticoagulante que no altera la morfología de los elementos celulares y además, preserva la sangre durante el tiempo necesario para en análisis (Chowdhury *et al.*, 2010).

- **En presencia de un agente proagregante**

Para inducir la activación de las plaquetas se emplea un potente agente proagregante, el ionóforo de calcio A23187, que ya había sido utilizado para inducir la agregación plaquetaria en estudios anteriores de agregometría *in vitro* en nuestro Departamento (Tofiño I, 2001). El mecanismo por el cual el ionóforo de calcio induce la activación plaquetaria consiste en un aumento de la concentración de Ca^{2+} en el interior de la plaqueta. Este aumento conduce a la formación de diferentes endoperóxidos y a la fosforilación de diversas proteínas que son necesarias para que se produzca la agregación (Leong HS *et al.*, 2011).

Además de comportarse como un proagregante, nuestros resultados demuestran que el ionóforo de calcio incrementa la producción de micropartículas (MPs), que se forman a partir de la superficie de distintos tipos de células en respuesta a la activación de las mismas, a una lesión, y/o a su apoptosis. Estas células pueden ser leucocitos, células endoteliales y células de la serie roja sanguínea. Aunque algunos autores como Siljander(2011) tratan de demostrar que el mayor porcentaje de MPs circulantes proviene de los megacariocitos, otros autores como López-Farré AJ (2012) continúan en la línea de adjudicar ese porcentaje a las micropartículas derivadas de plaquetas activadas (PMPs). Éstas son capaces de promover respuestas protrombóticas puesto que tienen propiedades similares a las plaquetas.

La técnica de citometría de flujo permite un análisis multiparamétrico simultáneo de las características físicas de las células sanguíneas célula a célula. Las PMPs tienen un diámetro que oscila entre 0.1 y 1 μ , mientras que el tamaño de las plaquetas suele ser de alrededor de 2-3 μ (Siljander PR, 2011). Estas variaciones de tamaño son detectadas con sensibilidad y registradas en el citómetro de flujo.

Tras el análisis en el citómetro, las plaquetas aparecen representadas en diferentes cuadrantes en función de su tamaño y complejidad estructural, diferenciándose tres regiones, la región 1 o distribución de agregados, la región 2 o distribución de plaquetas y la región 3 o distribución de PMPs (fig. 56) (Matijevic N, 2011).

Nuestros resultados muestran cómo al añadir ionóforo de calcio las plaquetas varían su distribución en la gráfica (*dot-plot*) (fig. 56). El número de plaquetas en la región 2

disminuye y se produce un aumento del número de agregados en la región 1, al igual que el de PMPs en la región 3.

En diversos estudios, los flavonoides han demostrado poseer capacidad para inhibir la agregación plaquetaria (Vázquez L, 2001; Mosaw S, 2013).

En los resultados obtenidos con este trabajo se observa cómo naringina a concentración 2mM inhibe casi totalmente el efecto del ionóforo de calcio sin que se produzcan cambios importantes en la distribución inicial de las plaquetas.

Quercetina, naringenina y diosmina también poseen capacidad antiagregante inhibiendo la agregación un 66%, 50 % y 30 %, respectivamente.

Rutina es el flavonoide con menor capacidad de inhibir la formación de agregados y sin embargo los resultados muestran cómo en presencia de este flavonoide se produce una importante disminución en la formación de PMPs (Fig. 70).

Si se contrastan estos resultados con los obtenidos en los estudios de ocupación del receptor GPIIb/IIIa se observa que en algunos casos como el de naringina y diosmina existe una correlación entre ambos efectos, ocupación del receptor e inhibición de la agregación plaquetaria. Esto no ocurre en el caso de quercetina, flavonoide con una importante actividad antiagregante que, sin embargo, no presenta unión al receptor.

Las diferencias estructurales entre los distintos productos parecen tener implicación en los efectos de los mismos. El grupo hidroxilo (-OH) situado en posición 4' podría estar relacionado con el efecto de estos compuestos, lo cual justificaría el menor efecto de diosmina y diosmetina, ya que dicho grupo se encuentra metilado (-OCH₃). La ausencia de doble enlace en el anillo C de las flavanonas también parece tener implicación en la actividad de estos compuestos.

Por otra parte, la posición del azúcar en los heterósidos puede plantear un impedimento estérico a la hora de ejercer su acción. Este es el caso de rutina, flavonoide que ha mostrado escaso efecto y que a su vez resulta ser el único que posee el azúcar unido a la posición 3.

Estos resultados difieren en algunos casos de los obtenidos por Wright B. *et al.* (1999) en un estudio comparativo del efecto antiagregante de distintos flavonoides en función de su estructura. Sus resultados muestran que los grupos funcionales más

importantes son los anillos B metilados y los anillos C no hidroxilados. Además, los flavonoles, como quercetina, parecen ser más potentes que las flavanonas, como naringina.

- **En ausencia de un agente proagregante**

Cuando se estudia el comportamiento de las plaquetas en ausencia de proagregante se observa que, a pesar de existir cierta afinidad de los productos estudiados por el receptor, dicha unión no provoca ningún cambio en las plaquetas. Su actividad se pone de manifiesto únicamente en presencia de un agente proagregante, impidiendo la acción de éste. Las gráficas muestran cómo los valores del control de sangre, de los controles positivos y de los fármacos, a cualquiera de sus concentraciones, son prácticamente los mismos, ya que las plaquetas no sufren modificaciones al adicionar los distintos productos.

Estos datos sugieren de nuevo que el comportamiento de los flavonoides pudiera deberse a un dualismo competitivo. Por sí mismos estos productos no presentan ningún efecto, en cambio ejercen su actividad antiagregante en situaciones patológicas en las que se liberan con intensidad agonistas endógenos.

En nuestros estudios se ha demostrado el efecto de los flavonoides sobre la agregación plaquetaria y sobre la reducción de PMPs, partículas que debido a su efecto protrombótico y proinflamatorio podrían considerarse como una nueva diana terapéutica en las enfermedades vasculares (López-Farré AJ, 2012.).

Puesto que se ha documentado el efecto de algunos flavonoides como protectores vasculares y vista la significativa capacidad antiagregante de estos compuestos, nos planteamos verificar también si son capaces de inhibir procesos inflamatorios estudiando la posible actividad de estos polifenoles sobre determinados mediadores proinflamatorios.

- EFECTO INMUNOMODULADOR SOBRE MEDIADORES PROINFLAMATORIOS

La respuesta del organismo frente al LPS incluye una sobreexpresión de una gran variedad de citoquinas, entre las que se encuentran el TNF- α y el IFN- γ , así como otros mediadores proinflamatorios. Hay una gran variedad de células involucradas en el proceso inflamatorio que responden al LPS, como los monocitos, los macrófagos, las células epiteliales, los neutrófilos y las células dendríticas, entre otras. Las citoquinas proinflamatorias más importantes son producidas principalmente por monocitos, aunque un 0,5% de la producción se atribuye a células dendríticas (Tapp LD, 2011). Estas citoquinas son IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8, siendo esta última una quimioquina que se libera en respuesta a la producción de IL-1 β (Han ZQ, 2015).

Algunos flavonoides se utilizan en terapéutica de modo empírico para combatir ciertas patologías vasculares, sobre todo, de tipo venoso. Asimismo está descrito que desempeñan una acción protectora en procesos inflamatorios. Aunque las diferencias estructurales entre ellos determinan diferencias significativas en su capacidad para disminuir el estrés oxidativo e inflamatorio en las células, en general, los datos obtenidos en la literatura apuntan hacia la existencia de efectos protectores relacionados con la modulación de la producción de citoquinas proinflamatorias (Chen J, 2012). Ciertos polifenoles como el resveratrol son capaces de inhibir determinadas citoquinas como TNF- α e IL-13 (Yang CJ, 2011). También es conocido el efecto inhibidor de la producción de IL-1 β por los polifenoles del té verde (Ellis LZ, 2011).

Todo ello refuerza la hipótesis inicial de este trabajo en relación con los fármacos seleccionados.

• Efecto sobre la producción de IL-1 β

Se sabe que IL-1 β induce muerte celular, apoptosis, inflamación, y estas actividades poseen una estrecha relación con los efectos moduladores de otros procesos, tales como aterosclerosis y otro tipo de patologías vasculares (Zheng Y, 2011).

En relación con los polifenoles, existen estudios en los que se relaciona su actividad antiinflamatoria con la inhibición de la producción de IL-1 β . Concretamente, la epigallocatequina, polifenol mayoritario del té verde, inhibe la producción de IL-1 β reduciendo el proceso inflamatorio en un determinado tipo de melanoma, según un estudio realizado por Ellis LZ *et al.* (2011).

Para nuestro estudio del efecto de los flavonoides sobre la producción de IL-1 β se ensayan dos controles positivos, reína (metabolito activo de la diacereína) y colchicina, con el fin de utilizar el más adecuado en los ensayos posteriores.

La diacereína es un profármaco autorizado para su uso en terapéutica como analgésico y antiinflamatorio. Se trata de un derivado diacetilado de la reína, un producto natural con estructura antraquinónica. Reduce la producción de IL-1 β , lo que redundará en una disminución de las acciones biológicas de ésta última. La IL-1 β parece tener un papel relevante a nivel sinovial, facilitando la destrucción ósea y del cartílago en el área articular (Catálogo de Medicamentos, 2016).

La colchicina es un fármaco antigotoso, que reduce la respuesta inflamatoria debida a la formación de cristales de urato en las articulaciones, ya que disminuye la migración leucocitaria e inhibe la fagocitosis de los cristales, con lo que reduce la producción de ácido láctico evitando así el pH ácido que facilitaría la precipitación de los cristales de urato. Este fármaco también está indicado en afecciones inflamatorias venosas y en esclerodermia, lo que nos lleva a utilizarlo como posible control positivo en nuestro estudio (Catálogo de Medicamentos, 2016).

En los experimentos *in vitro*, la colchicina manifiesta una escasa inhibición de la producción de IL-1 β , mientras que la reína la inhibe en un 41%, por lo que decidimos utilizar esta última como control positivo en los ensayos con los polifenoles. En el caso de reína los resultados son los esperados ya que su acción antiinflamatoria se debe a la inhibición específica de la IL-1 β ; sin embargo la colchicina, cuyo mecanismo de acción no se conocen profundamente, a pesar de poseer efecto antiinflamatorio, no inhibe IL-1 β .

Los resultados obtenidos muestran que quercetina es el flavonoide que presenta mayor capacidad para inhibir la producción de IL-1 β , aumentando su efecto con la concentración y presentando una inhibición del 87% a la concentración 2mM.

Diosmetina y naringenina también presentan altos porcentajes de inhibición de la producción de esta citoquina y, al igual que quercetina, se obtiene el máximo efecto a la concentración 2mM con inhibiciones del 72% y 74% respectivamente.

De los tres heterósidos estudiados naringina es el único con capacidad para inhibir la producción de IL-1 β . La concentración 2mM de este flavonoide presenta una inhibición del 44%, similar a la del control reína.

En este modelo experimental, rutina y diosmina no inhiben la producción de IL-1 β y presentan valores de producción de esta citoquina superiores a los obtenidos con LPS. Sin embargo, existen estudios en cultivos celulares con rutina cuyos resultados muestran una inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias por este flavonoide (Liu CJ, 2013).

Los flavonoides que presentan un grupo hidroxilo en posición 4' siguen siendo más activos, así como los que no poseen doble enlace (C₂-C₃) en el anillo C. Las geninas tienen mayor capacidad para inhibir la producción de IL-1 β que los heterósidos, apoyando la hipótesis del impedimento estérico debido al azúcar, planteada anteriormente.

- **Efecto sobre la producción de TNF- α**

Como ya se ha comentado anteriormente, existen numerosos estudios en los que se hace referencia al papel inhibitor de los flavonoides sobre la síntesis de mediadores proinflamatorios inducidos por LPS. Ueda y cols. (2004) mostraron que, aunque *in vitro* varios flavonoides de los distintos grupos (luteolina, crisina, apigenina, quercetina, miricetina y taxifolina) son capaces de inhibir la producción de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS, la estructura idónea para el mayor efecto antiinflamatorio *in vivo* es la de 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona.

El TNF- α está implicado junto con los leucocitos, el endotelio y otros tejidos en el transcurso de distintas agresiones celulares, como por ejemplo algunas infecciones.

Además, ejerce distintas funciones en diferentes órganos, como la activación de la producción de otros mediadores como la IL-1 y la IL-6. La liberación de TNF- α produce activación local del endotelio vascular, liberación de NO con vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, que conduce al reclutamiento de las células inflamatorias (Beyer EM *et al.*, 2012)

Los resultados obtenidos con quercetina muestran un potente efecto inhibidor de la producción de TNF- α proporcional a la concentración empleada, inhibiendo la producción de esta citoquina un 93% a la concentración 2mM. Diosmetina 2mM inhibe la producción de TNF- α un 84%. Tanto quercetina como diosmetina presentan mayor actividad que en los ensayos de inhibición de IL-1 β .

Por su parte, naringenina presenta un efecto muy similar al obtenido con IL-1 β con un porcentaje de inhibición de 67% a la concentración 2mM.

El heterósido naringina tiene actividad inhibitoria de la producción de TNF- α al igual que con IL-1 β y presenta un 44% de inhibición de la producción a la concentración 2mM.

Diosmina no tiene efecto sobre la producción de IL-1 β y, sin embargo, presenta una ligera capacidad de inhibir la producción de TNF- α , un 12% a la concentración 2mM.

Rutina no inhibe la producción de TNF- α y en este caso no se observa el aumento de producción de citoquina en presencia de este flavonoide que mostraban los resultados de inhibición de IL-1 β .

Excepto rutina, todos los flavonoides estudiados tienen capacidad de inhibir la producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α . En este caso las geninas son más activas que los heterósidos, al contrario de lo que ocurría en los ensayos de agregación plaquetaria por citometría de flujo. El flavonoide más activo en los estudios de modulación de la producción de citoquinas proinflamatorias es quercetina 2mM.

- Inflamación y procesos trombóticos

Se sabe que la inflamación desempeña un importante papel en la patogenia de varias enfermedades cardiovasculares. Los estudios llevados a cabo en los últimos 20 años avalan el hecho de que en todas las fases implicadas en el proceso aterosclerótico,

iniciación, crecimiento y complicaciones trombóticas, se produce un grado variable de inflamación crónica de la pared vascular en respuesta a diversos estímulos (dislipemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo, presencia de radicales libres, alteraciones genéticas, alteraciones metabólicas, infecciones por microorganismos, etc.) (Boshuizen MC, 2016).

La aterosclerosis tiene, por consiguiente, las características de un proceso inflamatorio, con expresión de citoquinas y factores quimiotácticos, responsables de los procesos de daño/reparación vascular relacionados con su desarrollo. La hipótesis inflamatoria de la aterosclerosis no sólo ha estimulado los más recientes avances en el conocimiento de la aterogénesis, sino que desde un punto de vista conceptual ha ofrecido una oportunidad para el desarrollo de nuevos tratamientos.

Las células inflamatorias activadas (neutrófilos, linfocitos, monocitos y macrófagos), las citoquinas proinflamatorias y las plaquetas activadas son protagonistas de este escenario. Hay por tanto una estrecha relación entre la inflamación y la trombosis; así como los procesos inflamatorios pueden favorecer un estado protrombótico, los componentes de la cascada de la coagulación también intervienen en la respuesta inflamatoria.

Datos experimentales y epidemiológicos sugieren que la disfunción endotelial, tras una infección o una inflamación, puede ser un factor de riesgo transitorio de enfermedad cardiovascular, que podría promover una respuesta vascular anormal. Quinn (2011) describe el importante papel que desempeñan ciertos péptidos de neutrófilos humanos en la modulación de la respuesta inflamatoria en aterosclerosis. En este trabajo, Quinn demuestra que la estimulación de células endoteliales de la arteria coronaria humana posee una gran relevancia clínica sobre la adhesión y migración leucocitaria, así como sobre la activación y agregación de las plaquetas.

Las plaquetas pueden activarse en los lugares donde existe un daño vascular o inflamación por trans migración leucocitaria. Los agregados, formados por plaquetas y leucocitos, son una demostración de la estrecha relación existente entre los procesos de trombosis e inflamación. La inhibición de determinadas citoquinas proinflamatorias podría contribuir a frenar el progreso de la enfermedad trombótica (Cerletti C *et al.*,

2012). Hwang (2011) estudia la importante contribución de la inflamación, en concreto los altos niveles de TNF- α e IL-6, al desarrollo de trombosis en implantaciones de stents. Por su parte, Lambert (2007) se centra en el papel que desempeñan las quimioquinas en la activación plaquetaria y en los procesos trombóticos, particularmente en aterosclerosis.

En los últimos años se ha desarrollado un amplio número de marcadores de inflamación con posible interés en la predicción y aparición de complicaciones cardiovasculares, que pueden ser de utilidad en la estratificación del riesgo vascular.

Son muchas las publicaciones que ponen de manifiesto la relación existente entre determinadas citoquinas y la agregación plaquetaria, actividades que pueden relacionarse con los resultados obtenidos en este trabajo, que incluyen, no sólo un cierto efecto antiagregante plaquetario, sino también una modulación de la producción de las principales citoquinas proinflamatorias por parte de algunos flavonoides (Devi KP, 2015; Kurita-ochiai T, 2014)

Los flavonoides objeto de estudio en este trabajo han demostrado, en mayor o menor medida, capacidad para modular la secreción de citoquinas proinflamatorias. Asimismo, todos han mostrado cierta capacidad antiagregante.

Naringina y naringenina son flavonoides pertenecientes al grupo de las flavanonas, es decir, no presentan grupo hidroxilo en el carbono de la posición 3 y carecen de doble enlace entre los carbonos 2 y 3. En los resultados obtenidos naringenina muestra una capacidad de unión al receptor plaquetario GPIIb/IIIa cuatro veces superior a la genina naringina. Además, en los estudios de actividad antiagregante, naringina resulta ser más eficaz que naringenina, mostrando una capacidad para inhibir la agregación plaquetaria del 90%, mientras que la de naringenina es de un 50%.

Por el contrario, la genina es más activa que el heterósido en lo referente a la inhibición de producción de citoquinas, sin que podamos razonar el por qué de este diferente comportamiento.

Diosmina y diosmetina presentan estructura flavónica, con doble enlace entre los carbonos 2 y 3 y ausencia de grupo hidroxilo en el carbono de la posición 3. Diosmina presenta mayor capacidad de unión al receptor GPIIb/IIIa y mayor capacidad

antiagregante que su genina, diosmetina, aunque en menor medida que naringenina, aglicón de naringina, que presenta un porcentaje de inhibición de la agregación del 30%.

Los resultados obtenidos con estos cuatro flavonoides sugieren que la presencia del azúcar intensifica la capacidad antiagregante por cuanto es la única diferencia estructural entre ellos.

Al igual que ocurría con naringenina, diosmetina inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias en un porcentaje elevado a diferencia de diosmina cuyos resultados muestran un aumento de la producción de citoquina en presencia de este flavonoide.

Quercetina es una flavona pentahidroxilada que constituye la genina del heterósido rutina.

En los resultados obtenidos con estos flavonoides rutina presenta mayor porcentaje de unión al receptor GPIIb/IIIa, como ocurría con las otras geninas naringina y diosmina. En cambio, la capacidad antiagregante de este flavonoide es casi nula, a diferencia del resto de heterósidos. En este sentido es importante destacar la localización del resto azucarado, ya que en el caso de la rutina, la presencia del mismo en la posición 3, limita la actividad. La presencia del azúcar en la posición 7, como es el caso de naringina y diosmina, incrementa notablemente su actividad. Este hecho ya se puso de manifiesto en experimentos anteriores de agregación plaquetaria *in vivo* (Vázquez C, 2001)

Quercetina es el aglicón que presenta mayor capacidad antiagregante, al tiempo que posee un potente efecto inhibidor de la producción de citoquinas proinflamatorias.

La mayor actividad de quercetina respecto al resto de las geninas podría ser debida al mayor número de grupos hidroxilo que posee en su estructura.

6. CONCLUSIONES

1- Los disolventes empleados habitualmente para disolver los flavonoides, etanol y metanol, no son adecuados para el estudio funcional de las plaquetas en nuestro modelo experimental *in vitro*. Para este modelo se ha determinado que el DMSO en alta dilución (1/500) es el disolvente más adecuado que permite el estudio del comportamiento de las plaquetas mediante citometría de flujo.

2- Los flavonoides naringenina, naringina, diosmetina, diosmina, quercetina y rutina son capaces de unirse al receptor GPIIb/IIIa de las plaquetas. Los estudios de ocupación han demostrado que los heterósidos naringina, diosmina y rutina muestran un porcentaje de ocupación mayor que las geninas naringenina, diosmetina y quercetina. Naringina presenta el mayor porcentaje de ocupación, siendo éste cuatro veces mayor que el de naringenina y el doble que diosmina o rutina.

3- El estudio de morfología de las plaquetas demuestra que los flavonoides naringenina, naringina, diosmetina, diosmina, quercetina y rutina poseen capacidad antiagregante.

4- Naringina y quercetina a concentración 2mM son los flavonoides que poseen mayor actividad presentado una capacidad antiagregante del 90% y 65% respectivamente. Por otro lado, rutina representa el flavonoide con menor actividad, siendo su capacidad antiagregante inferior al 5%.

5- Si bien naringina y diosmina son los heterósidos con mayor actividad respecto a su correspondientes geninas, naringenina y diosmetina respectivamente, quercetina presenta mayor actividad antiagregante que su heterósido rutina.

6- Las geninas quercetina, diosmetina y naringenina presentan una relevante capacidad inmunomoduladora, siendo capaces de inhibir la producción de las

citoquinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α con porcentajes de inhibición del 87% y 92% para quercetina; 71% y 84% para la diosmetina y 73% y 67% para naringenina, respectivamente.

7- El heterósido rutina no ha demostrado capacidad inmunomoduladora, diosmina posee muy baja capacidad inhibiendo la producción de IL-1 β y TNF- α ,en porcentajes del 1.5% y 15%, respectivamente. Por el contrario, naringina sí presenta capacidad inmunomoduladora inhibiendo la producción de IL-1 β y TNF- α hasta un 44% y 48%, respectivamente.

8- La presencia de mayor número de grupos hidroxilo en quercetina parece justificar la mayor actividad de este flavonoide. La presencia del azúcar en posición 7 en el caso de naringina y diosmina intensifica la actividad antiagregante. El azúcar en posición 3 de rutina limita la actividad de este flavonoide.

9- Los resultados obtenidos corroboran los estudios realizados anteriormente en nuestro departamento mediante experimentos *in vitro* e *in vivo* de inhibición plaquetaria con estos u otros fármacos de las mismas familias de polifenoles, a la vez que aportan información actualizada de la actuación de estos fármacos, abriendo puertas a su posible utilización en clínica.

7. BIBLIOGRAFIA

- AEMPS (2011). Medicamentos de Uso Humano. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2011 Mayo 25.
- ÁLAMO C (2001). "Uso de EFP en patologías cardiovasculares". En: Plan Nacional de Formación Continuada en Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo I. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España, 2001:129-164.
- ALEXIOS S, MARGARITIS M, LEE R, CHANNON K, ANTONIADES C (2012) "Statins as anti-inflammatory agents in atherogenesis: molecular mechanisms and lessons from the recent clinical trials". *Curr Pharm Des.*; 18(11): 1519–1530.
- AMIEL M, BARBE R (1998). "Etude de l'activité pharmacodynamique de Daflon 500 mg". *Ann Cardiol Angeiol Paris*; 47 (3): 185-8
- AMIRA S, ROTONDO A, MULÈ F (2008). "Relaxant effects of flavonoids on the mouse isolated stomach: structure-activity relationships". *Eur J Pharmacol.* Dec 3; 599(1-3):126-30.
- ANDREWS RK (2003). "Platelet physiology and thrombosis". *Thrombosis Research*; 114: 447-453.
- ANNAPURNA A et al. (2009). "Cardioprotective actions of two bioflavonoids, quercetin, and rutin, in experimental myocardial infarction in both normal and streptozotocin-induced type I diabetic rats" *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. Vol 61, Issue 10, pages 1365–1374, Oct 2009
- ARPIJUNTARANGKOON J, ROJNUCKARIN P, MUANPASITPORN C, KAEOTHIP S, SANGVANICH P, INTRAGUMTORNCHAI T (2007). "Molecular cloning and sequence analysis of alboaggregin B". *Platelets*; 18(4): 266-72

-
- BADRI H, BHATTACHARYA V (2008). "A review of current treatment strategies for varicose veins". *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*; 3(2):126-36.
 - BAE EA, HAN MJ, KIM DH (1999). "In vitro anti-helicobacter pylori activity of some flavonoids and their metabolites". *Planta Med*; 65 (5): 442-443
 - BAILEY DG, 2007. BAILEY DG, DRESSER GK, LEAKE BF, KIM RB (2007). "Naringin is a major and selective clinical inhibitor of organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2) in grapefruit juice". *Clin Pharmacol Ther*; 81(4):495-502.
 - BANNO A, GINSBERG MH (2008)." Integrin activation". *Biochem Soc Tran*; 36 (2): 229 34. Review.
 - BENNETT JS (2005). "Structure and function of the platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ ". *The Journal of Clinical Investigation*; 115: 12.
 - BOSHUIZEN MC, NEELE AE, GIJBELS MJ, VAN DER VELDEN S, HOEKSEMA MA, FORMAN RA, MULLER W, VAN DEN BOSSCHE J, DE WINTHER MP (2016). Myeloid interferon- γ receptor deficiency does not affect atherosclerosis in LDLR-/- mice. *Atherosclerosis*. 2016 Jan 19; 246:325-333.
 - BRAUNWALD E (2006). "Tratado de Cardiología". Vol. 2. 7ª ed. Elsevier; 2087.
 - BRUGTS JJ, MERCADO N, HU S, GUARNERI M, PRICE M, SCHATZ R, TEIRSTEIN P, WIJNS W, SERRUYS PW, O'NEILL WW, BOERSMA E (2009). "Relation of periprocedural bleeding complications and long-term outcome in patients undergoing percutaneous coronary revascularization (from the Evaluation of Oral Xemilofiban in Controlling Thrombotic Events [EXCITE] Trial". *Am J Cardiol*; 103 (7): 917-22
 - BRUNETON, J. (2014a). Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants. 199 ed. Acr, ed., Intercept, pp. 327-330.

-
- BRUNETON, J. (2014b). *Pharmacognosy: Phytochemistry, Medicinal Plants*. 199 ed. Acr, ed., Intercept, pp. 263-276.
 - BUCKSHEE A, TAKKAR D, AGGARWAL N (1997). "Micronized flavonoid therapy in internal hemorrhoids of pregnancy". *Int J Gynaecol Obstet*; 57 (2): 145-151
 - CALDERWOOD DA (2004). "Integrin activation". *Journal of Cell Science*; 117: 657-666.
 - CALDERWOOD DA (2004). "Integrin activation". *Journal of Cell Science*; 117: 657-666.
 - CALDERWOOD DA, SHATTIL SJ, GINBERG MH (2000). "Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signalling". *The Journal of Biological chemistry*; 275: 22607-22610.
 - CALVETE JJ (2004). "Structures of integrins domains and concerted conformational changes in the bidirectional signaling mechanism of $\alpha\text{IIb}\beta 3$ ". *Exp Biol Med*; 229: 732-744.
 - CALVETE JJ (2005). "Structure-function correlations of snake venom disintegrins". *Curr Pharm Des*; 11 (7): 829-35.
 - CANOBBIO I, STEFANINI L, CIPOLLA L, CIRAOLO E, GRUPPI C, BALDUINI C, HIRSCH E, TORTI M (2009). "Genetic evidence for a predominant role of PI3K {beta} catalytic activity in ITAM- and integrin-mediated signaling in platelets". *Blood*; 114(10):2193-6.
 - CARRETERO ME (2000). "Compuestos fenólicos: Flavonoides". *Panorama Actual Med*; 24(234):387-394.
 - CATÁLOGO DE MEDICAMENTOS (2016). Colección Consejo Plus. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.

-
- CATÁLOGO DE PLANTAS MEDICINALES (2011). Colección Consejo Plus. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos.
 - CHAVAKIS E, CHOI EY, CHAVAKIS T (2009). "Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade". *Thromb Haemost*; 102(2):191-7.
 - CHOE SC et al (2001) "Naringin has an antiatherogenic effect with the inhibition of intercellular adhesion molecule-1 in hypercholesterolemic rabbits". *J Cardiovasc Pharmacol*; 38(6):947-55.
 - COHEN JD (2007). "Overview of physiology, vascular biology, and mechanisms of hypertension". *Journal of Managed Care Pharmacy*; 13(5): 6-8
 - COPPINGER JA, MAGUIRE PB (2007). "Insights into the platelet releasate". *Current Pharmaceutocal Desing*; 13 (26): 2640-2646.
 - CRESPO ME, GALVEZ J, CRUZ T, OCETE MA, ZARZUELO A (1999). "Anti-inflammatory activity of diosmin and hesperidin in rat colitis induced by TNSB". *Planta Med*; 65 (7): 651-653
 - CUÉLLAR S (2012). "Vasculopatías: síndromes isquémicos cerebrales y trastornos vasculares periféricos". En: Avances en Farmacología y Farmacoterapia. Plan Nacional de Formación Continuada. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España. Módulo VI: Terapéutica farmacológica de los transtornos renales, vasculares y hematológicos. 2012. Pág. 313-66.
 - DE LA CRUZ JP, JA GONZÁLEZ-CORREA (2008). Capítulo 45. Pág 763-790. Farmacología Básica y Clínica, Velázquez. 18ªed. Ed: Panamericana.
 - DELAGADO L, VAZQUEZ A, FERNANDEZ E (2012). "Alternativas inmunoterapéuticas para el tratamiento de la aterosclerosis". *VacciMonitor* ;21(1):39-42.

-
- DEVI KP, MALAR DS, NABAVI SF, SUREDA A, XIAO J, NABAVI SM, DAGLIA M (2015). Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine *Pharmacol Res.* 2015 Sep; 99:1-10. May 14.
 - ENDALE M et al. (2013). "Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF-κB-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells" *Immunobiology* Volume 218, Issue 12, December 2013, Pages 1452–1467
 - ERGUSON JJ Y ZAQQA M (1999). "Platelet Glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonists". *Drugs*; 58: 965-982.
 - ESCUDERO JR, FERNANDEZ F (2013). "Prevalencia y características clínicas de la enfermedad venosa crónica en pacientes atendidos en Atención Primaria en España: resultados del estudio internacional Vein Consult Program". *Cirugía Española*; 91 (10): 623-692
 - ESPLUGUES JV, BARRACHINA MD (2008). Sección III, cap 21 "Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activador de las plaquetas". *Farmacología Humana*. Flórez; 391-406.
 - ESPLUGUES JV, BARRACHINA MD (2008). Sección III, cap 21 "Mediadores celulares II. Eicosanoides, óxido nítrico y factor activador de las plaquetas", pág 391-406. *Farmacología Humana*. Flórez. 5ª Ed. 2008.
 - ESTELLER A, CRIADO M. (2007). Principios de Fisiopatología para la atención farmacéutica. Módulo I. Capítulo 1, pág 3-29. *Fisiopatología: de la salud a la enfermedad*. Plan
 - ESTEVAN JM, MONREAL M, MARTORELL A (2005). Capítulo 79 pág 690-691. "Enfermedades de las venas" en Farreras-Rozman Medicina Interna. Volumen 1, 15ª ed, 2005.

-
- EVANS WC (1989). "Farmacognosia". Trease-Evans 13^o ed. Ed Interamericana Mc Graw-Hill.
 - FERENCZI E.A, MALIK IS, MAYET J, FOALE RA, AND FRANCIS DP. (2008). "Abciximab in coronary intervention for acute myocardial infarction and stable ischemic heart disease: early investment for growing benefit". *J Invasive Cardiol*; 20 (9):437-41.
 - FETTSEER DV, PREOBRAZHENSKII DV, BATYRALIEV TA, SIDORENKO BA, PATARAIA SA (2009). "Thienopyridines in the treatment and prevention of cardiovascular diseases". Part I. Ticlopidine, *Kardiologiia*; 49 (4):72-83.
 - FLAUMENHAFT R (2003). "Molecular Basis of Platelet Granule Secretion". *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 23: 1152-1160.
 - FLAUMENHAFT R (2006). "Formation and fate of platelet microparticles". *Blood Cells, Molecules and Diseases*; 36 (2): 182-187.
 - FORMICA JV Y REGELSON W, 1995); Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*. 1995 Dec; 33(12):1061-80.
 - FOX JE (1993). "The platelet cytoskeleton". *Thrombosis and Haemostasis*; 70 (6): 884-893
 - FRICK RW (2000). "Three treatments for chronic venous insufficiency: escin, hydroxyethylrutoside, and Daflon". *Angiology*; 51 (3): 197-205
 - FUSTER V, MORENO PR, FAYAD ZA, CORTI R, BADIMON JJ (2005). "Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts". *Journal of the American College of Cardiology*; 46 (6): 937-954.
 - GEORGE JN (2000). "Platelets". *The Lancet*; 335: 1531-1539.

-
- GIBBINS JM (2004). "Platelet adhesión signalling and the regulation of thrombus formation". *Journal of Cell Science*; 117: 3415-3425.
 - GIMBRONE MA, GARCIA-CARDEÑA G (2013) "Vascular endothelium, hemodynamics, and the pathobiology of atherosclerosis". *Cardiovascular Pathology*; 22: 9-15
 - GINSBERG MH, DU X, O'TOOLE E, LOFTUS JC (1995). "Platelet integrins". *Thromb Haemost*; 74 (1): 352-359.
 - GURBEL P.A. et al. (2010). Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the respond study. *Circulation*. 2010 Mar 16; 121(10):1188-99.
 - GUYTON A.C, HALL JE (2011). Tratado de Fisiología Médica. 12ª ed. Capítulo 15. "Distensibilidad vascular y funciones de los sistemas arterial y venoso". Pág 195.
 - GUYTON A.C, HALL JE (2011). Tratado de Fisiología Médica. 12ª ed. Capítulo 33 "Resistencia del organismo a la infección: I. Leucocitos, granulocitos, el sistema macrófago-monocítico e inflamación" pág 481-482.
 - GUYTON A.C, HALL JE (2011). Tratado de Fisiología Médica. 12ª ed. Capítulo 36 "Hemostasia y coagulación sanguínea", pág 505-507.
 - HÄMÄLÄINEN M, NIEMINEN R, VUORELA P, HEINONEN M, MOILANEN E (2007) "Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages". *Mediators Inflamm*; 45673.
 - HAN X, REN D, FAN P, SHEN T, LOU H (2008). "Protective effects of naringenin-7-O-glucoside on doxorubicin-induced apoptosis in H9C2 cells". *Eur J Pharmacol*; 581(1-2):47-53.

-
- HAN XZ, GAO S, CHENG YN, SUN YZ, LIU W, TANG LL, REN DM. (2012). "Protective effect of naringenin-7-O-glucoside against oxidative stress induced by doxorubicin in H9c2 cardiomyocytes. *Biosci Trends*. Feb;6(1):19-25.
 - HAN ZQ, HUANG T, DENG YZ, ZHU GZ (2015). Expression profile and kinetics of cytokines and chemokines in patients with chronic hepatitis C. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Oct 15;8 (10):17995-8003.
 - HANLEY M.J, CANCALON P, WIDMER WW, GREENBLATT DJ (2010). "The effect of grapefruit juice on drug disposition". *Expert Opin Drug Metab Toxicol*; Mar 7(3):267-86.
 - HANSSON GK, LIBBY P (2006). "The immune response in atherosclerosis: a double edged sword". *Nat Rev Immunol*.; 6 (7): 508-19
 - HANTGAN RR, STAHL MC, CONNOR JH, HORITA DA, ROCCO M, MCLANE MA, YAKOVLEV S, MEDVED L (2006). "Integrin α IIb β 3: ligand interactions are linked to binding-site remodeling". *Protein Sci*; 15(8):1893-906.
 - HANTGAN RR, STAHL MC, LORD ST (2010). "Dynamic regulation of fibrinogen: integrin α IIb β 3 binding". *Biochemistry*. 2; 49(43):9217-25.
 - HARTWIG JH (2006). "The platelet: form and function". *Seminars in Hematology*; 43 (1): 94-100.
 - HARTWIG JH, BARKALOW K, AZIM A, ITALIANO J (1999). "The elegant platelet: signals controlling actin assembly". *Thrombosis and Haemostasis*; 82 (2): 396-398.
 - HAVERSLAG R, PASTERKAMP G, HOEFER IE (2008). "Targeting adhesion molecules in cardiovascular disorders". *Cardiovascular Hematology Disorders Drug Targets*; 8 (4): 252-260 treatment". *Journal of Geriatric Cardiology*; 9: 305-317

-
- HENDERSON D, PATEL DV, TANTRY US (2010). "Response to ticagrelor in clopidogrel non responders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study". *Circulation*; 121: 1188-1199.
 - HIRAI S, KIM YI, GOTO T, KANG MS, YOSHIMURA M, OBATA A, YU R, KAWADA T (2007) "Inhibitory effect of naringenin chalcone on inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages". *Life Sci*; 81(16):1272-9.
 - HIRAI S, UEMURA T, MIZOGUCHI N, LEE JY, TAKETANI K, NAKANO Y, HOSHINO S, TSUGE N, NARUKAMI T, YU R, TAKAHASHI N, KAWADA T (2010). "Diosgenin attenuates inflammatory changes in the interaction between adipocytes and macrophages". *Mol Nutr Food Res*; 54(6):797-804.
 - INDRA MR et al. (2013). "Quercetin suppresses inflammation by reducing ERK1/2 phosphorylation and NF kappa B activation in Leptin-induced Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)" *BMC Research Notes*, 6:275
 - INOUE O, SUZUKI-INOUE K, DEAN W L, FRAMPTON J, WATSON SP (2003). "Integrin alpha(2)beta(1) mediates outside-in regulation of platelet spreading on collagen through activation of Src kinases and PLC-gamma 2". *Journal of Cell Biology*; 160: 769 780.
 - IYÚ D, GLENN JR, WHITE AE, FOX SC, DOVLATOVA N, HEPTINSTALL S (2011). "P2Y (12) and EP3 antagonists promote the inhibitory effects of natural modulators of platelet aggregation that act via cAMP". *Platelets*; 22 (7): 504-515.
 - JAGETIA A, JAGETIA GC, JHA S (2007). "Naringin, a grapefruit flavanone, protects V79 cells against the bleomycin-induced genotoxicity and decline in survival", *J Appl Toxicol*; 27(2):122-32
 - JULL A, ARROLL B, PARAG V, WATERS J (2007). "Pentoxifylline for treating venous leg ulcers". *Cochrane Database Syst Rev*; (3): CD001733. Review.

-
- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J (2005). "Histología Básica" Masson 6ª Ed.
 - JUTEAU N, BAKRY F, POMIES JP, FOULON C, RIGAUDY P, PILLION G, LANGE G, GENRE O, CRON JP (1995). "The human saphenous vein in pharmacology: effect of anew micronized flavonoidic fraction (Daflon 500 mg) on norepinephrine induced contraction". *Int Angiol*; 14 (3 Suppl 1): 39-43
 - KASIRER-FRIEDE A. "Platelet integrins and immunoreceptors". *Immunological Reviews*. 218: 247-264.
 - KAVUTCU M, MELZIG MF (1999). "In vitro effects of selected flavonoids on the 5' nucleotidase activity". *Pharmazie*; 54(6): 457-459
 - KENNETH K (2008). "Historical review: megakaryopoiesis and thrombopoiesis". *Blood*; 111: 981-986.
 - KORTHIUS RJ, GUTE DC (1997). "Post-ischemic leukocyte/endothelial cell interactions and microvascular barrier dysfunction in skeletal muscle. Cellular mechanisms and effect of Daflon 500 mg". *Int J Microcirc Clin Exp*; 17 Suppl 1: 11-17
 - KORTHIUS RJ, GUTE DC (1999). "Adhesion molecule expression in postischemic microvascular dysfunction: activity of a micronized purified flavonoid fraction". *J Vas Res*; 63 Suppl 1. 15-23
 - KUMAR V, ABBAS A, FAUSTO N (2010). "Patología estructural y funcional". Robins y Cotran. Elsevier 8ª Ed.
 - KURITA-OCHIAI T, YAMAMOTO M (2014). Periodontal pathogens and atherosclerosis: implications of inflammation and oxidative modification of LDL. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:595981. May 18.
 - LANGER HF, CHAVAKIS T (2009). "Leukocyte-endothelial interactions in inflammation" *J Cell Mol Med*; 13(7):1211-20.

-
- LANGER HF, CHAVAKIS T (2009). "Leukocyte-endothelial interactions in inflammation". *J Cell Mol Med*; 13(7):1211-20.
 - LAW DA, NANNIZI-ALAIMO L, COWAN KJ, PRASAD KSS, RAMAKRISHAN V, PHILIPPS DR (1999). "Signal transducción pathways for mouse platelet membrane adhesión receptors" *Thromb Haemost*; 82 (2): 345-352.
 - LIN JN et al. (2013). "Chemical constituents and anticancer activity of yellow camellias against MDA-MB-231 human breast cancer cells" *J Agric Food Chem*. Sep 3.
 - LING G, OVBIAGELE B (2009). "Oral antiplatelet therapy, in the secondary prevention of atherothrombotic events". *Am J Cardiovasc Drugs*; 9(3):197-209.
 - LÖSCHE W (2006). "Inhibition of platelet aggregation by grafting RGD and KGD sequences on the structural scaffold of small disulfide-rich proteins". *Platelets*; 17 (3):153-7).
 - LYN YC et al. (2013) "Impact of Flavonoids on Matrix Metalloproteinase Secretion and invadopodia Formation in Highly Invasive A431-III Cancer Cells". *PLoS One*. Aug
 - MAJERUS PW, TOLLEFSEN DM (2007). "Coagulación sanguínea y anticoagulantes, trombolíticos y antiplaquetarios". En: Las bases farmacológicas de la terapéutica, Goodman and Gilman, 11ª ed. Laurence L. Brunton, John S. Lazo, Keith L. Parker.
 - MAJEWSKA-WIEWSKA M (2012). "Anticancer activity of flavonoids". *Pol Mekur Lekarski*; 33(198): 364-9
 - MCCULLOUGH ML, PETERSON JJ, PATEL R, JACQUES PF (2012). "Flavonoid intake and cardiovascular disease mortality in a prospective cohort of US adults". *Am. J. Clin. Nutr*; Vol 95: 2: 454-464

-
- MCNICOL A, ISRAELS SJ (2008). "Beyond hemostasis: the role of platelets in inflammation, malignancy and infection". *Cardiovascular and Hematological Disorders*; 8 (2): 99-117
 - MEADOWS TA, BHATT DL (2007). "Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus Formation". *Circulation Research*; 100(9):1261-75.
 - MELIN AM, PERROMAT A, CLERC M (1996). "In vivo effect of diosmin on carragean and CCL₄-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes". *J Biochem Toxicol*; 11(1): 27-32
 - MELZIG MF, LOOSE R (1999). "Inhibition of lipopolysaccharide (LOP)-induced endothelial cytotoxicity by disomin"- *Pharmazie*; 54 (4): 298-299
 - MENG JC, ZHU QX, TAN RX (2000). "New antimicrobial mono-and sesquiterpenes from *Soroseris hookeriana* subsp. *Erysimoides*". *Planta Med*; 66 (6): 541-544
 - MERTEN M, PAKALA R, THIAGARAJAN P, BENEDICT R. "Platelet Microparticles Promote Platelet Interaction With Subendothelial Matrix in a Glycoprotein IIb/IIIa-Dependent Mechanism". *Circulation*. 1999;99:2577-2582.
 - MEYERS KJ et al. (2008). "Influence of Dietary Quercetin on Glutathione Redox Status in Mice" *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56 (3), pp 830–836
 - MHAWECH MD, SALEEM MD (2000). "Inherited Giant Platelet Disorders". *American Journal of Clinical Pathology*, 113, 176-190.
 - MOREL O, JESEL L, FREYSSINET JM, TOTI F (2011). "Cellular Mechanisms Underlying the Formation of Circulating Microparticles". *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*; 31: 15-26.
 - MORENO PR, FUSTER V (2006). "Atherosclerosis". *Current Molecular Medicine*; 6 (5): 437-438.

-
- MORIN B, NICHOLS LA, ZALASKY KM, DAVIS JW, MANTHEY JA, HOLLAND LJ (2008). "The citrusflavonoids hesperetin and nobiletin differentially regulate low density lipoprotein receptor gene transcription in HepG2 liver cells". *J Nutr*; 138(7):1274-81.
 - MUHLESTEIN JB (2010). "Effect of antiplatelet therapy on inflammatory markers in atherothrombotic patients". *Thromb Haemost.*; 103(1):71-82
Statins as Anti Inflammatory Agents in Atherogenesis: Molecular Mechanisms and Lessons from the Recent Clinical Trials
 - NAKAMURA F (2006). "The structure of the GPIIb-filamin A complex". *Blood*; 107:1925-1932.
 - NIESWANDT B, WATSON SP (2003). "Platelet-collagen interaction: is GPIIb the central receptor?" *Blood*; 102: 449-461.
 - O'DONELLA CJ, ELOSUAC R (2008). "Cardiovascular Risk Factors. Insights From Framingham Heart Study". *Rev Esp Cardiol*; 61 (3): 299-310
 - OBAIDAT A, ROTH M, HAGENBUCH B (2011). "The Expression and Function of Organic Anion Transporting Polypeptides in Normal Tissues and in Cancer". *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. Jan 17.
 - PÁRAMO JA (2007). "Principios de Fisiopatología para la atención farmacéutica". Módulo I. Plan Nacional de Formación Continuada 2007. Cap 6: 129-148.
 - PARÉS JO, JUAN J, TELLEZ R, MATA A, MORENO C, QUER FX, SUAREZ D, CODONY I, ROCA (2010). "Varicose vein surgery: stripping versus the CHIVA method: a randomized controlled trial". *Ann Surg*; 251(4):624-31.
 - PECKING AP, FEVRIER B, WARGON C, PILLION G (1997). "Efficacy of Daflon 500 mg in the treatment of lymphedema (secondary to conventional therapy of breast cancer)". *Angiology*; 48 (1): 93-98

-
- PEÑA JJ (2012). Asignatura de Inmunología. Universidad de Córdoba.
 - PEREZ JL, CASTRO DEL POZO S (2004). Inflamación. En “Medicina Interna “. Ed. Rodés Teixidor J. y Guardia Massó J. Editorial Masson. Cap.3 pag.20. 2ªed. 2004
 - PEREZ JL, CASTRO DEL POZO S. Inflamación. En “Medicina Interna“. Ed. Rodés; Teixidor J. y Guardia Massó J. Editorial Masson. Cap.3 pag.20. 2ªed. 2004.
 - PICKELMANN S, NOLTE D, LEIDERER R, MOLLMANN M, SCHUTZE E, MESSMER K (1999). “Effects of the phlebotropic drug Daflon 500 mg on postischemic reperfusion injury in striated skin muscle: a histomorphologic study in the hamster”. *J Lab Clin Med*, 134 (5): 536-545
 - PRABU SM, SHAGIRTHA K, RENUGADEVI J (2011). “Naringenin in combination with vitamins C and e potentially protects oxidative stress-mediated hepatic injury in cadmium-intoxicated rats”. *J Nutr Sci Vitaminol*; 57(2):177-85.
 - QUINTIERI L, PALATINI P, MORO S, FLOREANI M. (2011). “Inhibition of cytochrome P450 2C8-mediated drug metabolism by the flavonoid diosmetin”. *Drug Metab Pharmacokinet.*; 26(6):559-68.
 - RAJADURAI M, PRINCE PS (2007). “Preventive effect of naringin on cardiac mitochondrial enzymes during isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: a transmission electron microscopic study”. *J Biochem Mol Toxicol*; 21(6):354-6.
 - RAMELET EE (2000). “Pharmacologic aspects of a phlebotropic drug in CVI-associated edema”. *Angiology*; 51 (1): 19-23.
 - RAND JH, WU XX, QUINN AS, TAATJES DJ (2008).” Resistance to annexin A5 anticoagulant activity: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid síndrome”. *Lupus*; 17(10):922-30. Review

-
- RAO RM, YANG L, GARCIA-CARDENA G, LUSCINSKAS FW (2007). "Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular Wall". *Circ Res*; 101(3):234-47.
 - RAÚL I (1997). "El descubrimiento de las plaquetas". *Rev Biomed*; 8:197-208.
 - REED GL (2004). "Platelet secretory mechanisms". *Semin Throm Hemost*; 30 (4): 441 450.
 - REISS S, SIEBER M, OBERLE V, WENTZEL A, SPANGENBERG P, CLAUS R, KOLMAR H.
 HIPERLINK:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=L%C3%B6sche%20W%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=16702041" LÖSCHE W. (2006).
Inhibition of platelet aggregation by grafting RGD and KGD sequences on the structural scaffold of small disulfide-rich proteins.
 HYPERLINK"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%09REISS+S%2C+SIEBER+M%2C+OBERLE+V%2C>" \o "Platelets." *Platelets* 2006 May; 17(3):153-7.
 - RERIARI MK, FLAMMER AJ, JAMA A, LERMAN LO, LERMAN A (2012). "Novel Functional Risk Factors for the Prediction of Cardiovascular Events in Vulnerable Patients Following Acute Coronary Syndrome". *Circ J*;76:778–783
 - ROCHA E. ABAD RICO JI, LLAU PITARCH JV, ROCHA E (2010). "Overview of venous thromboembolism". *Drugs*;70 Suppl 2:3-10
 - RODRÍGUEZ FJ (2012). "Terapéutica de los trastornos neoplásicos inmunológicos". Programa de actualización en Farmacología y Farmacoterapia. Módulo VIII. Cap 3, pág 51-74. Avances en inmunología, inflamación y dolor. PNFC, 2012.
 - RUGGERI ZM (2003). "Von Willebrand factor, platelets, and endothelial cell interactions". *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 1: 1335-1342. 2003.

-
- RUGGERI ZM (2007). "Adhesion Mechanisms in Platelets Function". *Circulation Research*; 100: 1673-1685.
 - SAELMAN EU, NIEUWENHUIS HK, HESE KM, GROOT PG, HEIJNEN HF, SAGE EH, WILLIAMS S, MCKEOWN L, GRALNICK HR, SIXMA JJ. (1994). "Platelet adhesion to collagen types I through VIII under conditions of stasis and flow is mediated by GPIa/IIa (alpha 2 beta 1-integrin)". *Blood*; 83 (5): 1244-1250.
 - SANTORO SA (1991). "Distinct determinants on collagen support α II β I integrin mediated platelet adhesion and platelet activation". *Cell Regulation*; 2:905-913.
 - SAPONARA S, TESTAI L, IOZZI D, MARTINOTTI E, MARTELLI A, CHERICONI S, SGARAGLI G, FUSI F, CALDERONE V (2006). "(+/-)-Naringin as large conductance Ca (2+)-activated K⁺ (BKCa) channel opener in vascular smooth muscle cells". *Br J Pharmacol* .Dec; 149(8):1013-21.
 - SARRATT KL, HONG CHEN, ZUTTER M, SANTORO SA, HAMMER DA, KAHN ML (2005). "GPVI and α 2 β 1 play independent critical roles during platelet adhesion and aggregate formation to collagen under flow". *Blood*; 106 (4): 1268-1277.
 - SAVAGE B, RUGGERI ZM (2002). "Platelet thrombus formation in flowing blood". *Platelets*; Cap.18: 359-375.
 - SCHMUGGE M (2003). "Platelets and von Willebrand factor". *Transfusion and Apheresis Science*; 28 (3): 269-277.
 - SCHRÖR K, HUBER K (2009). " Prasugrel for the treatment of patients with acute coronary Síndrome". *Vasc Health Risk Manag*; 5(1):321-4.
 - SCHULZE H (2005). "Mechanisms of thrombopoiesis". *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 3 (8): 1717-1724.

-
- SEFARTY D, MAGNERON AC (1997). "Le syndrome premenstruel en France: epidemiologie et activite therapeutique de 1000 mg de fraction micronise chez 1473 femmes consultant en gynecologie". *Contracep Fertil Sex*; 25 (1): 85-90
 - SHERRY L, JIAQUAN XU, KENNETH D (2010). "Death: final data for 2010". *National Vital Statistics Report*; 61:4
 - SHOAB SS, PORTER J, SCURR JH, COLERIDGE-SMITH PD (1999). "Endothelial activation response to oral micronised flavonoid therapy in patients with chronic venous disease, a prospective study". *Eur J Endovas Surg*; 17 (4): 313-318
 - SIESS W (1989). "Molecular mechanisms of platelet activation". *Physiol Rev*; 69 (1): 58-178.
 - SILBERBERG M, GIL-IZQUIERDO A, COMBARET L, REMESY C, SCALBERT A, MORAND C (2006). "Flavanone metabolism in healthy and tumor-bearing rats. *Biomed Pharmacother*"; 60(9):529-35.
 - SMITH PD (1999). "Neutrophil activation and mediators of inflammation in chronic venous insufficiency". *J Vasc res*; 36 suppl 1: 24-36
 - STEEVELS TA, MEYAARD L (2011). "Immune inhibitory receptors: Essential regulators of phagocyte function". *Eur J Immunol*; 41(3):575-87.
 - STOREY RF, NIELSEN T, EIKELBOOM JW, SABE-AFFAKI G, HUSTED S, KEREIAKES DJ,
HYPERLINK":http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Henderson%20D%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=20194878"
 - TANTRY US (2010). Response to ticagrelor in clopidogrel nonresponders and responders and effect of switching therapies: the RESPOND study.
HYPERLINK:"<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%09STOREY+RF%2C>

+NIELSEN+T%2C+EIKELBOOM+JW%2C+SABE-AFFAKI"\o"Circulation."

Circulation. 2010 Mar 16;121(10):1188-99

- STRUCKMANN JR (1999). "Clinical efficacy of micronized purified flavonoid fraction: an overview". *J Vasc Res*; 36 suppl 1: 37-41
- SWARNKAR G, SHARAN K, SIDDIQUI JA, MISHRA JS, KHAN K, KHAN MP, GUPTA V, RAWAT P, MAURYA R, DWIVEDI AK, SANYAL S, CHATTOPADHYAY N (2011) "Identification of a Rare Naringenin Analog from a Medicinal Plant having Potent Bone Anabolic Effect by Acting as an Osteoblast Oestrogen Mimic". *Br J Pharmacol*. Aug 22.
- TAMARGO J (2005). "Nuevas aproximaciones para el tratamiento de las enfermedades Cardiovasculares". *Anal Real Acad Nac Farm*; 71: 905-947.
- TAMARGO J, CUELLAR S, GÓMEZ R (2007). "Enfermedades vasculares periféricas". *Principios de Fisiopatología para la atención farmacéutica. Módulo I. Plan Nacional de Formación Continuada*; Cap 13: 279-29.
- TAMARGO J, GÓMEZ R, VAQUERO LM (2007). "Hiperlipidemias y Arteriosclerosis". *Principios de Fisiopatología para la atención farmacéutica. Módulo I. Plan Nacional de Formación Continuada*; Cap 10; 217-235.
- TAMARGO J (2003). Plantas medicinales que actúan sobre el aparato cardiovascular. En: *Plan Nacional de Formación Continuada en Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo III. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España*, 2003:11-36.
- THEIVACUMAR NS, GOUGH MJ (2011). "Endovenous Laser Ablation (EVLA) to Treat Recurrent Varicose Veins". *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011 Feb 26.
- TRESGUERRES JF (2010). "Fisiología Humana" McGraw-Hill 4ª Ed. Pág 75-78.

-
- TRIGGLE CR, MATHEWS S, RAVISHANKAR S, MAREI I, ARUNACHALAM G, DING H. (2012) "The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways". *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90: 713–738
 - TROXLER M (2007). "Platelet function and antiplatelet therapy". *British Journal of Surgery*; 94 (6): 674-682
 - TSOUMANI ME, KALANTZI KI, GOUDEVENOS IA, TSELEPIS AD "Platelet-Mediated Inflammation in Cardiovascular Disease. Potential Role of Platelet-Endothelium Interactions". *Current Vascular Pharmacology*; 10 (5): 439-549.
 - TSUI V.W, WONG RW, RABIE AB (2008). "The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro". *Phytother Res.* Mar; 22(3):401-6.
 - TUÑÓN M.J, GARCÍA-MEDIAVILLA MV, SÁNCHEZ-CAMPOS S, GONZÁLEZ-GALLEGO J (2009) "Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways". *Curr Drug Metab*; 10(3):256-71.
 - VALENCIA C. Insuficiencia venosa crónica. *Rev Patol Vasc.* 2011.
 - VALENTAO P, FERRERES F, RIBEIRO V, IZQUIERDO AG, RODRIGUES MA, SEABRA RM, ANDRADE PB, VALENTÃO P (2006). "Rumex induratus leaves: interesting dietary source of potential bioactive compounds". *J Agric Food Chem.* 54(16):5782-9.
 - VALLEJO F, LARROSA M, ESCUDERO E, ZAFRILLA MP, CERDÁ B, BOZA J, GARCÍA-CONESA MT, ESPÍN JC, TOMÁS-BARBERÁN FA (2010). "Concentration and solubility of flavanones in orange beverages affect their bioavailability in humans". *J Agric Food Chem*; 58(10):6516-24.
 - VAN'T HOF AW, VALGIMIGLI M (2009). "Defining the role of platelet glycoprotein receptor inhibitors in STEMI: focus on tirofiban". *Drugs*; 69 (1): 85-100.

-
- VARGA-SZABO D (2008). "Cell Adhesion Mechanisms in Platelets". *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 28: 403-412.
 - VP ANDROUTSOPOULOS, K RUPARELIA, RRJ ARROO (2009). "CYP1-mediated antiproliferative activity of dietary flavonoids in MDA-MB-468 breast cancer cells" *Toxicology*; Volume 264, Issue 3, 29 October 2009, Pages 162–170
 - WANG BS, HUANG GJ, TAI HM, HUANG MH (2012). "Antioxidant and anti-inflammatory activities of aqueous extracts of *Schizonepeta tenuifolia* Briq". *Food Chem Toxicol*. Mar;50(3-4):526-3
 - WANG W.Y, HSIEH PW, WU YC, WU CC (2007). "Synthesis and pharmacological evaluation of novel beta-nitrostyrene derivatives as tyrosine kinase inhibitors with potent antiplatelet activity". *Biochem Pharmacol*; 74(4):601-11.
 - WATSON SP (1999). "Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes". *Journal of Thrombosis and Haemostasis*; 82 (2): 365-376.
 - WEI M, YANG Z, LI P, ZHANG Y, SSE WC (2007). "Anti-osteoporosis activity of naringin in the retinoic acid-induced osteoporosis model". *Am J Chin Med*; 35(4):663-7.
 - WITTCHEN ES (2009). "Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration". *Front Biosci*; 14:2522-45.
 - WOLF P (1967). "The nature and significance of platelet products in human plasma". *British Journal of Haematology*; 13 (3): 269-288
 - WOLFF T, MILLER T, KO S (2009). "Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: an update of the evidence for the U.S. Preventive Services Task Force". *Ann Intern Med*; 150(6):405-10.

-
- YOO AR, KOH SH, CHO GW, KIM SH (2010). "Inhibitory effects of cilostazol on proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMCs) through suppression of the ERK1/2 pathway". *J Atheroscler Thromb*; 17(10):1009-18.
 - YU PX et al. (2013). "Effects of quercetin on LPS-induced disseminated intravascular coagulation (DIC) in rabbits". *Thromb Res*. Jun; 131(6):270-3.
 - ZARBOCK A, LEY K (2011). "Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and Recruitment". *Arch Biochem Biophys*; 510(2):112-9.
 - ZARZUELO A, COMALADA M, BALLESTER I, BAILÓN E, SIERRA S, XAUS J, GÁLVEZ J, DE MEDINA FS (2006). "Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship". *Biochem Pharmacol*. 16; 72 (8):1010-21.
 - ZHANG J, ALCAIDE P, LIU L, SUN J, HE A, LUSCINSKAS FW, SHI GP (2011). "Regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by mast cells, macrophages and neutrophils"
- HYPERLINK"http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21264293" \o "PloS one."
 PLoS One.2011 Jan 14;6(1):e14525.
- ZHENG Y, GARDNER SE, CLARKE MC. (2011). Cell death, damage-associated molecular patterns, and sterile inflammation in cardiovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Dec; 31(12):2781-6.